



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124244- -00000-0000

Fecha: 2011-09-22 16:35:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO: **FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 47/48**

71. SOLICITANTE: **GLAXO GROUP LIMITED**

DOMICILIO: **MIDDLESEX, INGLATERRA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____

057 2011

(FORMA P 10).

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124244- -00000-0000

Fecha: 2011-09-22 16:35:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **GLAXO GROUP LIMITED.**

Dirección: Glaxo Wellcome House,
Berkeley Avenue, Greenford Middlesex
UB6 0NN, Inglaterra.

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex,
Inglaterra.

Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **HERRING, Christopher; HOLT, Lucy J.; JESPER, Laurent S.;
MAYER, Sebastian y PUPECKA, Malgorzata.**

Dirección: Domantis Limited, 315 Cambridge Science Park, Cambridge,
Cambridgeshire CB4 0WG.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/053806

Fecha: 24/03/10

Publicación Internacional No. WO 2010/108937 A3

Fecha: 30/09/10

⑥

Título (54)

"FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 47/48

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

27/03/09

(31) Número de Solicitud

61/163,917

⑨

Comprobante de Pago No. 11-0089474

Fecha: 13 de Septiembre de 2011

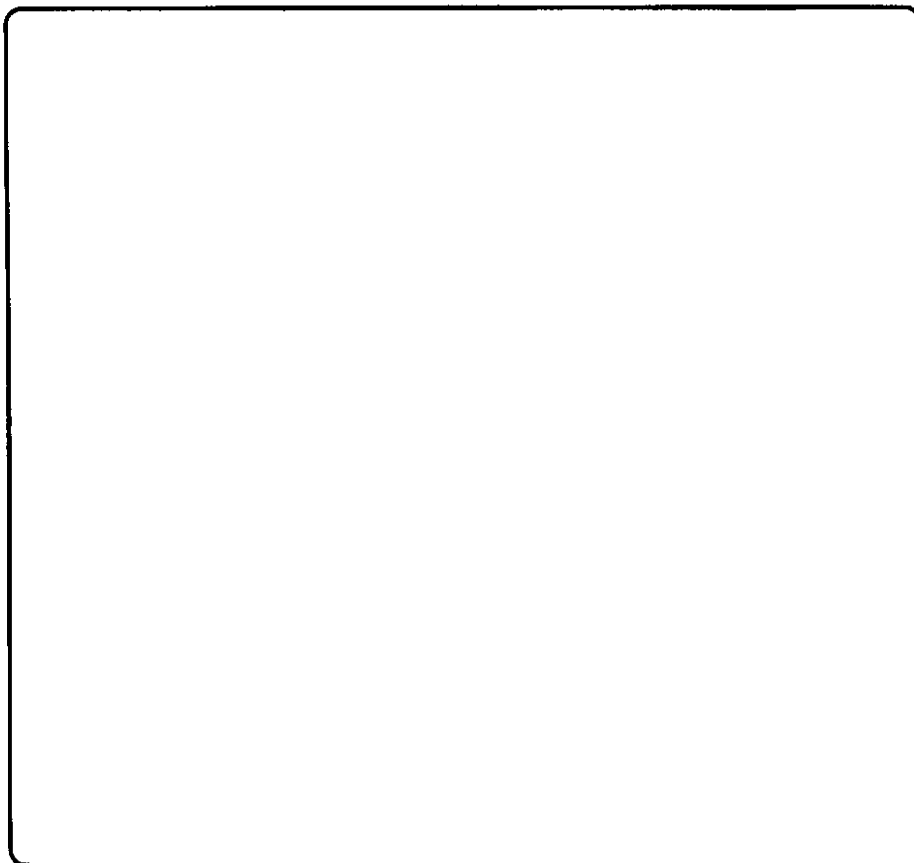
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones. (Declaración bajo las Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii) que acreditan el traspaso de los inventores al solicitante)
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

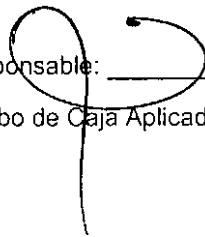
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0089474
		Bogotá D.C., Septiembre 13 de 2011 - 07:40:03

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA S.A.	NI 8.300.221.455
----------------------------------	------------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414999620	12/09/2011	20.066.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00 571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-124244-00000-0000
Fecha: 2011-09-22 16:35:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

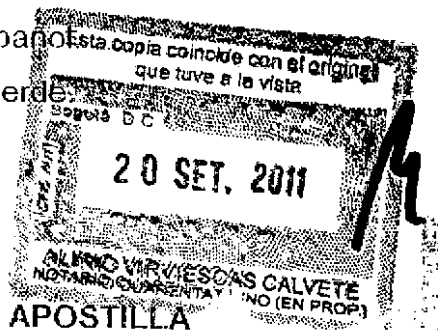

ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español. Hay un sello rojo sobre una cinta verde.



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado por Martin E Buchner
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 26 de agosto de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número G499865
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)

Sello de la Oficina de Asuntos

M. Monaghan

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258650
Ana Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2001 SET -3 P 12:12

mes
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIEBCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROPIA)

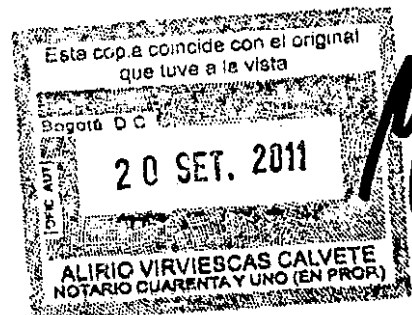
Exteriores y del Commonwealth

Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **Martin Emil BUCHNER**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**GLAXO GROUP LIMITED**", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

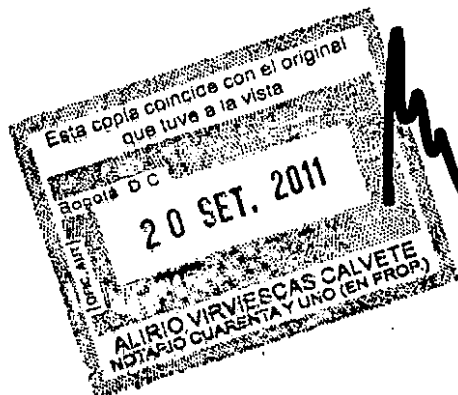
QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.



Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martin E Buchner**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté
6. the/le **26 August 2004**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G499865**

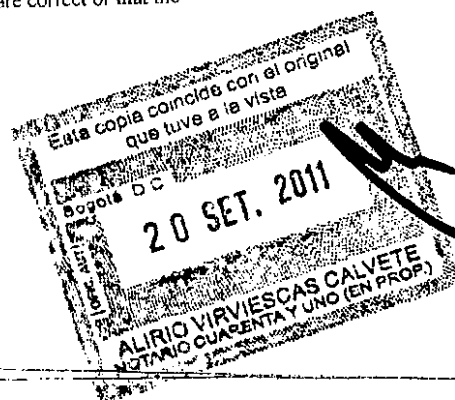
9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **M. Monaghan**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



Los abajo firmados, **GLAXO GROUP LIMITED**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales...

con domicilio en **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Inglaterra

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue en su nombre.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXO GROUP LIMITED**, a corporation organized and existing under the laws of England and Wales.

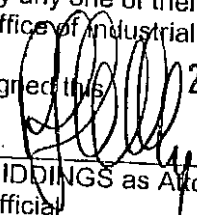
domiciled at **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Great Britain

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this **23 AUG 2004**


Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorized Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 47/48	
(22) Fecha de solicitud: 22-09-11		(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/163,917	(32) Fecha 27-03-09	(33) País US
		(72) Inventor(es): HERRING, Christopher; HOLT, Lucy J.; JESPER, Laurent S.; MAYER, Sebastian y PUPECKA, Malgorzata.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 27-10-11		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 30-09-10
	Fecha de presentación de la solicitud: 24-03-10		No. publicación: WO 2010/108937 A3
	No. De solicitud: PCT/EP2010/053806		
(54) Título: "FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO"			

Resumen.-Reivindicación(es):

Resumen.-.

La presente invención se refiere a fusiones de fármaco que tienen semividas en suero mejoradas. Estas fusiones y conjugados comprenden polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulina (anticuerpos) y moléculas de GLP y/o exendina. La invención se refiere además a usos, formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden tales fusiones y conjugados de fármaco.

Sector: Preparaciones medicamentosas caracterizadas porque el ingrediente no activo está unido químicamente al ingrediente activo, por ejemplo conjugados de fármaco polímero, y que contienen fármacos para desórdenes metabólicos como hiperglicemia, por ejemplo, antidiabéticos, e inmunoglobulinas contra material de animales o humanos.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
Industria y Comercio		DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES	
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION		PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) No. De solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 22-09-11	
(51) Clasificación Internacional: A61K 47/48			
(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED			
(72) Inventor(es): HERRING, Christopher; HOLT, Lucy J.; JESPER, Laurent S.; MAYER, Sebastian y PUPECKA, Malgorzata.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/163,917	27-03-09	US
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 27-10-11		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 30-09-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 24-03-10		No. publicación: WO 2010/108937 A3	
No. de solicitud: PCT/EP2010/053806			
(54) Título: "FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO"			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO		
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____				
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 22-09-11		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm		
(51) Clasificación Internacional: A61K 47/48				
(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED				
(72) Inventor(es): HERRING, Christopher; HOLT, Lucy J.; JESPER, Laurent S.; MAYER, Sebastian y PUPECKA, Malgorzata.				
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE				
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/163,917	(32) Fecha 27-03-09	(33) País US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-10-11		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 24-03-10 No. de solicitud: PCT/EP2010/053806		Fecha: 30-09-10 No. Publicación : WO 2010/108937 A3		
(54) Título: "FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO"				
(57) <u>Resumen.-Reivindicación (es):</u>				
Resumen.- La presente invención se refiere a fusiones de fármaco que tienen semividas en suero mejoradas. Estas fusiones y conjugados comprenden polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulina (anticuerpos) y moléculas de GLP y/o exendina. La invención se refiere además a usos, formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden tales fusiones y conjugados de fármaco.				
Sector: Preparaciones medicamentosas caracterizadas porque el ingrediente no activo está unido químicamente al ingrediente activo, por ejemplo conjugados de fármaco polímero, y que contienen fármacos para desórdenes metabólicos como hiperglicemia, por ejemplo, antidiabéticos, e inmunoglobulinas contra material de animales o humanos.				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference LMK/DB63558	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/053806	International filing date (day/month/year) 24/03/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 27/03/2009
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/053806

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/053806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K16/18
ADD. A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/059106 A2 (DOMANTIS LIMITED) 8 June 2006 (2006-06-08) examples 10-18 claims	1-32
Y	W-F. DOU ET AL.: "Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in Pichia pastoris." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 61, no. 1, 10 May 2008 (2008-05-10), pages 45-49, XP002591535 USA abstract	1-32
----- -/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 July 2010

Date of mailing of the international search report

08/10/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, Frans

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/053806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L. HOLT ET AL.: "Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half lives of short lived drugs." PROTEIN ENGINEERING, DESIGN & SELECTION, vol. 21, no. 5, May 2008 (2008-05), pages 283-288, XP002591536 England abstract discussion	1-32
Y	WO 2008/149143 A2 (DOMANTIS LIMITED) 11 December 2008 (2008-12-11) example 16 sequence 99 figure 51a	1-32
X,P	WO 2009/121804 A1 (GLAXO GROUP LIMITED) 8 October 2009 (2009-10-08) examples claims figure 1 sequences 8-10	1-6,8,9, 11-29, 31,32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/053806

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-32

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-32

A fusion or conjugate composition comprising or consisting of (a) an insulintropic agent or an incretin drug present as a fusion or a conjugate with (b) a dAb which binds serum albumin selected from (i) the DOM 7h-14 domain antibody (dAb), (ii) the DOM 7h-14-10 dAb, or a dAb which has up to 4 amino acid differences from the sequences of the DOM7h-14-10 dAb, and (iii) the DOM7h-11-15 dAb, or (iv) the DOM7h-14-10 R108C dAb. (Pharmaceutical) composition and formulations, and (therapeutic) uses thereof. Encoding nucleic acids. Vector. Host cell. Method of production.

2. claims: 33-37

A modified leader sequence which has at its C teminal end the amino acid sequence AMA or AWA, wherein the leader sequence is not the wild type sequence. Use of said sequence.

3. claims: 38, 39

A process of producing a mixture of (i) an insulintropic agent or an incretin drug; and (ii) an insulintropic agent or an incretin drug minus two amino acids at the N-terminus of the insulintropic agent or incretin drug, the process comprising the step of expressing (i) in a host cell using a leader sequence which results in cleavage before position 1 and cleavage before position 3 of said insulintropic agent or incretin drug.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/053806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006059106 A2	08-06-2006	AU 2005311099 A1 BR PI0518761 A2 CA 2589800 A1 CN 101128487 A EP 1841796 A2 JP 2008521869 T KR 20070094909 A NZ 555464 A SG 157423 A1 US 2009214534 A1	08-06-2006 09-12-2008 08-06-2006 20-02-2008 10-10-2007 26-06-2008 27-09-2007 26-03-2010 29-12-2009 27-08-2009
WO 2008149143 A2	11-12-2008	CN 101848935 A WO 2008149144 A2 WO 2008149146 A2 JP 2010528645 T JP 2010528646 T	29-09-2010 11-12-2008 11-12-2008 26-08-2010 26-08-2010
WO 2009121804 A1	08-10-2009	NONE	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 September 2010 (30.09.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/108937 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/053806

(22) International Filing Date:
24 March 2010 (24.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/163,917 27 March 2009 (27.03.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **HERRING, Christopher** [GB/GB]; Domantis Limited, 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB). **HOLT, Lucy J.** [GB/GB]; Domantis Limited, 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB). **JESPERS, Laurent S.** [BE/GB]; Domantis Limited, 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB). **MAYER, Sebastian** [DE/GB]; Domantis Limited, 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB). **PUPECKA, Malgorzata** [PL/GB]; Domantis Limited, 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB).

(74) Agents: **KUCERNAK (NEE WILSON), Lynn et al.**; GlaxoSmithKline, Global Patents CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
25 November 2010

(54) Title: DRUG FUSIONS AND CONJUGATES

(57) Abstract: The present invention relates to drug fusions that have improved serum half lives. These fusions and conjugates comprise polypeptides, immunoglobulin (antibody) single variable domains and GLP and/or exendin molecules. The invention further relates to uscs, formulations, compositions and devices comprising such drug fusions and conjugates.

WO 2010/108937 A3

FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a fusiones de fármaco que tienen
5 semividas en suero mejoradas. Estas fusiones y conjugados comprenden
polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulina (anticuerpos) y
moléculas de GLP y/o exendina. La invención se refiere además a usos,
formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden tales fusiones y
conjugados de fármaco.

10

Sector: Preparaciones medicamentosas caracterizadas porque el ingrediente
no activo está unido químicamente al ingrediente activo, por ejemplo
conjugados de fármaco polímero, y que contienen fármacos para desórdenes
15 metabólicos como hiperglicemia, por ejemplo, antidiabéticos, e
inmunoglobulinas contra material de animales o humanos.

FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO

La presente invención se refiere a fusiones y conjugados de fármaco que tienen semividas séricas mejoradas. Estas fusiones y conjugados comprenden dominios variables únicos de inmunoglobulina (anticuerpo) y moléculas de GLP y/o exendina. La invención se refiere además a usos, formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden tales fusiones y conjugados de fármaco.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Muchos fármacos que poseen actividades que podrían ser útiles para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico tienen un valor limitado debido a que se eliminan rápidamente del organismo cuando se administran. Por ejemplo, muchos polipéptidos que tienen actividades terapéuticamente útiles se eliminan rápidamente de la circulación a través del riñón. Por consiguiente, se tiene que administrar una dosis grande para conseguir un efecto terapéutico deseado. Existe una necesidad de agentes terapéuticos y de diagnóstico mejorados que tengan propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Una clase de fármacos de este tipo que tiene una semivida corta en el organismo o la circulación sistémica es la de las hormonas incretinas tales como péptido similar a Glucagón- 1 o Péptido YY y también exendina, por ejemplo exendina-4.

El péptido similar a Glucagón (GLP)-1 es una hormona incretina con potentes acciones insulínótropicas y glucagonostáticas dependientes de glucosa, efectos tróficos sobre las células β pancreáticas y efectos inhibidores sobre la secreción y motilidad gastrointestinal, que se combinan para disminuir la glucosa plasmática y reducen las fluctuaciones glucémicas. Además, por su capacidad de mejorar la saciedad, el GLP-1 reduce la ingesta de alimentos,

limitando de este modo la ganancia de peso y puede provocar incluso pérdida de peso. Tomadas en conjunto, estas acciones proporcionan al GLP-1 un perfil único, considerado altamente deseable para un agente antidiabético, particularmente ya que la dependencia de glucosa de sus efectos antihiper glucémicos debe minimizar cualquier riesgo de hipoglucemia grave. Sin embargo, su perfil farmacocinético/farmacodinámico es tal que el GLP-1 nativo no es terapéuticamente útil. Por tanto, aunque el GLP-1 es más eficaz cuando se administra de forma continua, las inyecciones subcutáneas únicas tienen efectos a corto plazo. El GLP-1 es altamente susceptible a degradación enzimática *in vivo* y la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es probablemente lo más pertinente, ya que esto tiene lugar rápidamente y genera un metabolito no insulínico. Por lo tanto, las estrategias para aprovechar el potencial terapéutico de GLP-1, basándose en una comprensión de factores que influyen en su estabilidad metabólica y perfil farmacocinético/farmacodinámico, han sido el centro de una intensa investigación.

Se ha realizado un extenso trabajo para intentar inhibir la peptidasa o para modificar GLP-1 de tal manera que se ralentice su degradación manteniendo todavía la actividad biológica. El documento WO05/027978 describe derivados de GLP-1 que tienen un perfil de acción prolongado. El documento WO 02/46227 describe proteínas de fusión heterólogas que comprenden un polipéptido (por ejemplo, albúmina) fusionado con GLP-1 o análogos (la descripción de estos análogos se incorpora en este documento como referencia como ejemplos de análogos de GLP-1 que se pueden usar en la presente invención). Los documentos WO05/003296, WO03/060071,

WO03/059934 describen una proteína de fusión amino en la que el GLP-1 se ha fusionado con albúmina para intentar aumentar la semivida de la hormona.

Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos no se ha producido un GLP-1 activo a largo plazo.

- 5 De este modo existe una tremenda necesidad, particularmente en los campos de diabetes y obesidad, de péptidos de GLP-1 mejorados u otros agentes tales como exendina-4 o PYY que tengan de forma similar un efecto insulínico susceptible de tratamiento para diabetes y obesidad en particular. Por tanto, existe una necesidad de modificar GLP-1, exendina-4 y
- 10 otros péptidos insulínicos para proporcionar una mayor duración de acción *in vivo* manteniendo sus ventajas de baja toxicidad y terapéuticas.

SUMARIO DE LA INVENCION

- La presente invención proporciona una composición que es una fusión o un conjugado y que comprende o está constituida por (a) un agente o molécula
- 15 insulínica o un fármaco o molécula de incretina que puede ser, por ejemplo, una exendina-4, PYY por ejemplo, 3-26 PYY o un GLP-1 por ejemplo, el mutante A8G de GLP-1 (7-37), presente como una fusión o un conjugado con (b) un dAb que se une específicamente a albúmina sérica (AlbudAb TM) seleccionado entre: (i) el anticuerpo de dominio (dAb) DOM 7h-14 (la secuencia
- 20 de aminoácidos de DOM 7h-14 se muestra en la Figura 1(h): SEC ID N° 8), (ii) el dominio de anticuerpo (dAb) DOM 7h-14-10 (la secuencia de aminoácidos de DOM 7h-14-10 se muestra en la Figura 1(o): SEC ID N° 26) o un dAb que tiene hasta 4 diferencias de aminoácidos de la secuencia del dAb DOM 7h-14-10; y
- (iii) el dAb DOM 7h-11-15 (de la secuencia de aminoácidos de DOM 7h-11-15
- 25 se muestra en la Figura 1(p): SEC ID N° 27) o (iv) el anticuerpo de dominio

(dAb) DOM 7h-14-10 R108C (la secuencia de aminoácidos de DOM 7h-14-10 se muestra en la Figura 1(r).

Un engarce aminoacídico o químico también puede estar presente opcionalmente uniendo el agente insulínico o fármaco incretina, por ejemplo, exendina-4 y/o GLP-1, o PYY con el dAb por ejemplo, con el DOM7h-14 dAb, DOM 7h-14-10 dAb, DOM 7h-11-15 dAb. El engarce puede ser, por ejemplo, un engarce helicoidal, por ejemplo el engarce helicoidal de la secuencia mostrada en la Figura 1 (k): SEC ID N° 11, o puede ser un engarce gly-ser, por ejemplo, con una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (l): SEC ID N° 12.

En ciertas realizaciones, las fusiones (o los conjugados) de la invención pueden comprender moléculas adicionales, por ejemplo, péptidos o polipéptidos adicionales.

El agente insulínico o fármaco incretina (por ejemplo, exendina y/o GLP-1) puede estar presente como una fusión (o un conjugado) con el extremo N o el extremo C del dAb.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido que comprende o que está constituido por una molécula de fusión que se ha seleccionado entre las siguientes:

- (a) fusión de 2xGLP-1 (7-37) A8G dAb DOM7h-14 (DAT0114, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (a): SEC ID N° 1)
- (b) fusión de exendina 4 (engarce G4S)3 dAb DOM7h-14 (DAT0115, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(b): SEC ID N° 2),
- (c) fusión de exendina 4 - dAb DOM7h-14 (DAT0116, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (c): SEC ID N° 3).

- (d) Fusión de exendina 4, engarce helicoidal, dAb DOM7h-14 (DAT0117, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(d): SEC ID N° 4).
- (e) fusión de GLP-1 (7-37) A8G (engarce G4S)3 dAb DOM7h-14 (DAT0118, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (e): SEC ID N° 5),
- 5 (f) fusión de GLP-1 (7-37) A8G dAb DOM7h-14 (DAT0119, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(f): SEC ID N° 6),
- (g) fusión de GLP-1 (7-37) A8G, engarce helicoidal, dAb DOM7h-14 (DAT0120, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (g): SEC ID N° 7),
- (h) fusión de exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10 (DMS7139, la
- 10 secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (m): SEC ID N° 24),
- (i) fusión de exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-11-15 (DMS7143, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (n): SEC ID N° 25).

La invención también proporciona moléculas de conjugado que comprenden o que están constituidas por las secuencias de aminoácidos de las

15 que se han descrito anteriormente, es decir, aquellas con las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEC ID N° 1-7 y SEC ID N° 24-25.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido que comprende o que está constituido por una molécula de conjugado que es:

un AlbuAb DOM 7h-14-10 (R108C) conjugado con PYY3-36 amidado en el

20 extremo C por una lisina (introducida en la posición 10 de PYY) y un engarce de PEG de 4 repeticiones. La secuencia de aminoácidos y la estructura de este conjugado peptídico se muestran en la Figura 14.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende o que está constituido por la secuencia de aminoácidos de la fusión exendina 4,

25 engarce (G4S)3 DOM7h-14-10 (DMS7139, la secuencia de aminoácidos se

muestra en la Figura 1 (m): SEC ID N° 24), o una molécula de fusión o de conjugado que tiene hasta 4 cambios de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DMS7139, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (m).

- 5 DOM 7h-14 es un dominio variable único de inmunoglobulina humana o dAb (Vk) que se une a albúmina sérica y su secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(h): SEC ID N° 8. Las regiones CDR del dAb DOM 7h-14 están subrayadas en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1(h): SEC ID N° 8.
- 10 DOM 7h-14-10 es un dominio variable único de inmunoglobulina humana o dAb que se une a albúmina sérica y su secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(o): SEC ID N° 26. Las regiones CDR del dAb DOM 7h-14-10 están subrayadas en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1(o): SEC ID N° 26.
- 15 DOM 7h-11-15 es un dominio variable único de inmunoglobulina humana o dAb que se une a albúmina sérica y su secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(p): SEC ID N° 27. Las regiones CDR del dAb DOM 7h-11-15 están subrayadas en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1(p): SEC ID N° 27.
- 20 Como se usa en este documento, "fusión" se refiere a una proteína de fusión que comprende como un primer resto un dAb DOM7h-14 o un dAb DOM7h-14-10 o un dAb DOM 7h-11-15 que se une a albúmina sérica y como un segundo resto, un agente insulínico o un fármaco incretina. El dAb que se une a albúmina sérica y el fármaco o agentes están presentes como partes
- 25 separadas (restos) de una única cadena polipeptídica continua. El primer (dAb)

- y segundo (fármaco incretina o agente insulínico) restos se pueden unir directamente entre sí mediante un enlace peptídico o enlazar mediante un aminoácido adecuado o engarce peptídico o polipeptídico. Si es apropiado, pueden estar presentes restos adicionales, por ejemplo, péptidos o polipéptidos (por ejemplo, tercero, cuarto) y/o secuencias de engarce. El primer resto puede estar en un emplazamiento N-terminal, emplazamiento C-terminal o interno con respecto al segundo resto. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión contiene uno o más de un resto dAb (por ejemplo, de uno a aproximadamente 20).
- 10 Como se usa en este documento, "conjugado" se refiere a una composición que comprende un dAb que se une a albúmina sérica a la que se une covalente o no covalentemente un agente insulínico o un fármaco incretina por ejemplo, GLP-1, Exendina-4, PYY por ejemplo, PYY 3-36. El agente insulínico o fármaco incretina se puede unir covalentemente al dAb
- 15 directamente o indirectamente mediante un resto de engarce adecuado, por ejemplo, un resto de engarce de PEG. El fármaco o agente se puede unir al dAb en cualquier posición adecuada, tal como el extremo amino, el extremo carboxilo o por cadenas laterales de aminoácidos adecuados (por ejemplo, el grupo ε amino de lisina o el grupo tiol de cisteína). Como alternativa, el fármaco
- 20 o agente se puede unir no covalentemente al dAb directamente (por ejemplo, interacción electrostática, interacción hidrófoba) o indirectamente (por ejemplo, mediante unión no covalente de compañeros de unión complementarios (por ejemplo, biotina y avidina), donde un compañero se une covalentemente al fármaco o agente y el compañero de unión complementario
- 25 se une covalentemente al dAb).

La invención proporciona además un monómero (sustancialmente) puro de cualquiera de los conjugados o fusiones de la invención, por ejemplo, de DAT0114, DAT 0115, DAT0116, DAT0117, DAT0118, DAT0119 y DAT120, DMS 7139 o DMS 7143 o DMS 7143. En una realización, es un monómero al
5 menos al 98, 99, 99,5% puro o al 100% puro.

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican las fusiones descritas en este documento, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican DAT0114, DAT 0115, DAT0116, DAT0117, DAT0118, DAT0119 y DAT120, DMS 7139 o DMS 7143 y, por ejemplo, donde las secuencias de
10 ácido nucleico se muestran en la Figura 2 (SEC ID N° 13-32). También se proporcionan células huésped que comprenden estos ácidos nucleicos.

La invención también proporciona aminoácidos que codifican dAb que se unen a albúmina sérica (AlbudAbs TM) seleccionados entre: DOM7h-14 (SEC ID N° 8), DOM7h-14-10 (SEC ID N° 26), DOM7h-11-15 (SEC ID N° 27) y DOM
15 7h-14-10R108C (SEC ID N° 42)

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican dAb que se unen a albúmina sérica seleccionados entre: DOM7h-14 (SEC ID N° 23), DOM7h-14-10 (SEC ID N° 31), DOM7h-11-15 (SEC ID N° 32) y DOM 7h-14-10R108C (SEC ID N° 44).

20 La invención proporciona además un procedimiento para producir una fusión de la presente invención, procedimiento que comprende mantener una célula huésped que comprende un ácido nucleico y/o construcción recombinante que codifica una fusión de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico recombinante, por lo que
25 se produce una fusión.

La invención también proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden una fusión o un conjugado de la invención.

La invención también proporciona un procedimiento para tratar un
5 individuo que tiene una enfermedad o trastorno, tal como las que se describen en este documento, por ejemplo, una enfermedad metabólica tal como hiperglucemia, tolerancia a la glucosa alterada, deficiencia de células beta, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo 1 o de tipo 2 o diabetes gestacional) u
obesidad o enfermedades caracterizadas por una comida en exceso, por
10 ejemplo, se puede usar para suprimir el apetito, por ejemplo, en el síndrome de Prader-Willi y que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una fusión o un conjugado de la invención.

Otros trastornos metabólicos, incluyen, pero sin limitación, resistencia a insulina, deficiencia de insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, dislipidemia,
15 hiperlipidemia, hipercetonemia, hipertensión, arteriopatía coronaria, aterosclerosis, insuficiencia renal, neuropatía (por ejemplo, neuropatía autónoma, neuropatía parasimpática y polineuropatía), retinopatía, cataratas, trastornos metabólicos (por ejemplo, trastornos metabólicos de insulina y/o glucosa), trastornos endocrinos, obesidad, pérdida de peso, trastornos
20 hepáticos (por ejemplo, enfermedad hepática, cirrosis del hígado y trastornos asociados con trasplante de hígado) y afecciones asociadas con estas enfermedades o trastornos.

Además, las afecciones asociadas con diabetes que se pueden evitar o tratar con los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación,
25 hiperglucemia, obesidad, retinopatía diabética, mononeuropatía, polineuropatía,

aterosclerosis, úlceras, cardiopatía, apoplejía, anemia, gangrena (por ejemplo, de los pies y las manos), impotencia, infección, catarata, mala función renal, mal funcionamiento del sistema nervioso autónomo, función alterada de los glóbulos blancos, síndrome de túnel carpiano, contractura de Dupuytren y

5 cetoacidosis diabética.

La invención también proporciona procedimientos para tratar o prevenir enfermedades asociadas con hiperglucemia que comprenden administrar al menos una dosis de los conjugados o las fusiones y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención al paciente o sujeto.

10 La invención se refiere además a procedimientos para regular la capacidad de respuesta a insulina en un paciente así como a procedimientos para aumentar la captación de glucosa por una célula y a procedimientos para regular la sensibilidad a insulina de una célula, usando los conjugados o las fusiones de la invención. También se proporcionan procedimientos para

15 estimular la síntesis y liberación de insulina, mejorar la sensibilidad de tejido adiposo, muscular o hepático a la captación de insulina, estimular la captación de glucosa, ralentizar el proceso digestivo o bloquear la secreción de glucagón en un paciente, que comprenden administrar a dicho paciente una fusión o un conjugado de la invención, por ejemplo, que comprenden administrar al menos

20 una dosis del conjugado o las fusiones de fármaco y/o la composición farmacéutica de la presente invención.

Las fusiones o los conjugados y/o las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otras moléculas o restos, por ejemplo, polipéptidos, proteínas y/o moléculas terapéuticas (por

25 ejemplo insulina y/u otras proteínas (incluyendo anticuerpos) péptidos o

moléculas pequeñas que regulan la sensibilidad a insulina, el peso, cardiopatía, hipertensión, neuropatía, metabolismo celular y/o niveles de glucosa, insulina u otra hormona en un paciente). En realizaciones específicas, los conjugados o las fusiones de la invención se administran en combinación con insulina (o un
5 derivado, análogo, proteína de fusión o secretagogo de insulina).

La invención también proporciona el uso de un conjugado o una fusión de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, tal como cualquiera de los que se han mencionado anteriormente, por ejemplo, un trastorno metabólico tal como
10 hiperglucemia, diabetes (diabetes de tipo 1 ó 2 o diabetes gestacional) u obesidad.

La invención también se refiere al uso de una fusión o un conjugado como se describe en este documento para el uso en terapia, diagnóstico o profilaxis.

15 Las fusiones o los conjugados de la invención, por ejemplo, el componente dAb de la fusión se pueden formatear adicionalmente para tener un mayor tamaño hidrodinámico para prolongar adicionalmente la semivida, por ejemplo, por unión de un grupo PEG, albúmina sérica, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción de unión a transferrina en el mismo, una
20 región Fc de anticuerpo o por conjugación con un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, el dAb que se une a albúmina sérica se puede formatear como un mayor fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, formatear como un Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

En otras realizaciones de la invención descritas a lo largo de esta
25 descripción, en lugar del uso de un "dAb" en una fusión de la invención, se

considera que el experto puede usar un dominio que comprende las CDR de un dAb por ejemplo, las CDR de DOM 7h-14, DOM 7h-14-10 o DOM 7h-11-15 que se une a albúmina sérica (por ejemplo, CDR injertadas en una armazón o esqueleto de proteína adecuado, por ejemplo, una proteína artificial (*affibody*),
5 un armazón de SpA, un dominio de receptor de LDL de clase A o un dominio de EGF). La descripción como una totalidad se tiene que considerar en consecuencia para proporcionar la descripción de tales dominios en lugar de un dAb.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una fusión o un
10 conjugado de acuerdo con la invención que comprende un agente insulínico o fármaco incretina y un ligando doblemente específico o un ligando multiespecífico que comprende un primer dAb de acuerdo con la invención que se une a albúmina sérica, por ejemplo, DOM 7h-14, DOM 7h-14-10 o DOM 7h-11-15 y un segundo dAb que tiene la misma especificidad de
15 unión o una diferente del primer dAb y opcionalmente en el caso de ligandos multiespecíficos dAb adicionales. El segundo dAb (o dAb adicional) puede unirse opcionalmente a una diana diferente, por ejemplo, diana FgFr 1c o CD5.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona las fusiones o los conjugados de la invención para el suministro por administración parenteral,
20 por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, inhalación, administración nasal, administración a través de la mucosa, administración oral, administración al tracto GI de un paciente, administración rectal o administración ocular. En un aspecto, la invención proporciona el uso de las fusiones o los conjugados de la invención en la preparación de un
25 medicamento para la administración por inyección subcutánea, inhalación,

administración intravenosa, administración nasal, administración a través de la mucosa, administración oral, administración al tracto GI de un paciente, administración rectal o administración ocular.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la
5 administración a un paciente por inyección subcutánea, administración pulmonar, administración intravenosa, administración nasal, administración a través de la mucosa, administración oral, administración al tracto GI de un paciente, administración rectal u ocular, donde el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una fusión o
10 un conjugado de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona una formulación oral, inyectable, inhalable, nebulizable u ocular que comprende una fusión o un conjugado de la invención. La formulación puede ser un comprimido, píldora, cápsula, líquido o jarabe. En un aspecto, las composiciones se pueden administrar por vía oral,
15 por ejemplo, como una bebida, por ejemplo, comercializada como una bebida para pérdida de peso para el tratamiento de obesidad. En un aspecto, la invención proporciona una formulación para la administración rectal a un paciente, la formulación se puede proporcionar, por ejemplo, como un supositorio.

20 Se puede preparar una composición para la administración parenteral de compuestos de GLP-1, por ejemplo, como se describe en el documento WO 03/002136 (incorporado en este documento como referencia).

Se puede preparar una composición para la administración nasal de ciertos péptidos, por ejemplo, como se describe en la Patente Europea N°
25 272097 (de Novo Nordisk A/S) o en el documento WO 93/18785 (todos

incorporados en este documento como referencia).

El término "sujeto" o "individuo" se define en este documento para incluir animales tales como mamíferos incluyendo, pero sin limitación, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos,
5 conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, equinas, caninas, felinas, de roedor o murinas.

La invención también proporciona un kit para el uso en la administración de composiciones de acuerdo con la invención (por ejemplo conjugados o fusiones de la invención) a un sujeto (por ejemplo, paciente), que comprende
10 una composición (por ejemplo, conjugado o fusión de la invención), un dispositivo de administración de fármaco y, opcionalmente instrucciones para el uso. La composición (por ejemplo, conjugado o fusión) se puede proporcionar como una formulación, tal como una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones el dispositivo de suministro de fármaco se selecciona del grupo
15 constituido por una jeringa, un inhalador, un dispositivo de administración intranasal u ocular (por ejemplo, un nebulizador, cuentagotas ocular o nasal) y un dispositivo de inyección sin aguja.

Las composiciones (por ejemplo, conjugados o fusiones) de esta invención se pueden liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un
20 vehículo adecuado antes del uso. Se puede emplear cualquier procedimiento de liofilización adecuado (por ejemplo, secado por pulverización, secado por torta) y/o técnicas de reconstitución. Se entenderá por los expertos en la materia que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad de anticuerpo y que los niveles de uso pueden tenerse
25 que ajustar para compensar. En una realización particular, la invención

proporciona una composición que comprende una composición liofilizada (por ejemplo, conjugado de fármaco, fusión de fármaco) como se describe en este documento. Preferiblemente, la composición liofilizada (por ejemplo, conjugado de fármaco, fusión de fármaco) pierde no más de aproximadamente el 20% o
5 no más de aproximadamente el 25%, o no más de aproximadamente el 30%, o no más de aproximadamente el 35%, o no más de aproximadamente el 40%, o no más de aproximadamente el 45% o no más de aproximadamente el 50% de su actividad (por ejemplo, actividad de unión para albúmina sérica) cuando se rehidrata. La actividad es la cantidad de composición (por ejemplo, conjugado
10 de fármaco, fusión de fármaco) necesaria para producir el efecto de la composición antes de que se liofilizara. Por ejemplo, la cantidad de conjugado o fusión necesaria para conseguir y mantener una concentración sérica deseada durante un periodo de tiempo deseado. La actividad de la composición (por ejemplo, conjugado de fármaco, fusión de fármaco) se puede
15 determinar usando cualquier procedimiento adecuado antes de la liofilización y la actividad se puede determinar usando el mismo procedimiento después de la rehidratación para determinar la cantidad de actividad perdida.

La invención también proporciona formulaciones de liberación sostenida que comprenden las fusiones o los conjugados de la invención, tales
20 formulaciones de liberación sostenida pueden comprender la fusión al conjugado de la invención en combinación con, por ejemplo, ácido hialurónico, microesferas o liposomas y otros vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéutica o farmacológicamente aceptables. Tales formulaciones de liberación sostenida pueden estar en forma, por ejemplo, de supositorios.

25 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica

que comprende una fusión o un conjugado de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

La invención también proporciona, una secuencia líder modificada, que tiene en su extremo C terminal la secuencia de aminoácidos AMA o AWA, 5 donde la secuencia líder no es la secuencia de tipo silvestre. La secuencia líder modificada puede ser OmpA-AMA o -AWA; o OmpT-AMA o -AWA; o GAS-AMA o -AWA.

La secuencia líder modificada se puede usar para la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula huésped. El polipéptido heterólogo puede 10 comprender o estar constituido por un agente insulínico o un fármaco incretina. El polipéptido heterólogo puede comprender o estar constituido por un anticuerpo de dominio (dAb) por ejemplo, un dAb que se une a albúmina sérica.

El polipéptido heterólogo para la expresión por el líder modificado puede 15 ser una fusión o un conjugado que comprende o que está constituido por (a) un agente insulínico o un fármaco incretina presente como una fusión o un conjugado con (b) un dAb por ejemplo, un dAb que se une a albúmina sérica, por ejemplo, un dAb seleccionado entre: el anticuerpo de dominio (dAb) DOM 7h-14 V_k que se une a albúmina sérica y que tiene la secuencia de 20 aminoácidos mostrada en la Figura 1(h) (SEC ID N° 8), el dAb DOM 7h-14-10 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1(o) (SEC ID N° 26), y el dAb DOM 7h-11-15 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1(p) (SEC ID N° 27).

La secuencia líder modificada también se puede usar para la expresión 25 de un polipéptido heterólogo que comprende o que está constituido por una

fusión seleccionada entre:

- (a) fusión de 2xGLP-1 (7-37) A8G dAb DOM7h-14 (DAT0114, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (a): SEC ID N° 1)
- (b) fusión de Exendina 4 (engarce G4S)3 dAb DOM7h-14 (DAT0115, la
5 secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(b): SEC ID N° 2),
- (c) fusión de Exendina 4 - dAb DOM7h-14 (DAT0116, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (c): SEC ID N° 3).
- (d) fusión de Exendina 4, engarce helicoidal, dAb DOM7h-14 (DAT0117, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(d): SEC ID N° 4).
- 10 (e) fusión de GLP-1 (7-37) A8G (engarce G4S)3 dAb DOM7h-14 (DAT0118, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (e): SEC ID N° 5),
- (f) fusión de GLP-1 (7-37) A8G dAb DOM7h-14 (DAT0119, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1(f): SEC ID N° 6),
- (g) fusión de GLP-1 (7-37) A8G, engarce helicoidal, dAb DOM7h-14 (DAT0120,
15 la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (g): SEC ID N° 7),
- (h) fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10 (DMS7139, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (m): SEC ID N° 24),
- (i) fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-11-15 (DMS7143, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (n): SEC ID N° 25).

20 El polipéptido heterólogo a expresar por el líder modificado también puede comprender o estar constituido por moléculas de conjugado con las secuencias de aminoácidos de las que se han descrito anteriormente, es decir, aquellas con las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEC ID N°- 1-7 y las SEC ID N° 24-25.

25 El polipéptido heterólogo a expresar por el líder modificado también

puede comprender o estar constituido por la secuencia de aminoácidos de la fusión de Exendina 4, engarce (G4S)₃ DOM7h-14-10 (DMS7139, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (m): SEC ID N° 24), o una molécula de fusión o de conjugado que tiene hasta 4 cambios de aminoácidos de la

5 secuencia de aminoácidos de DMS7139, la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (m).

La célula huésped para expresión puede ser una célula huésped microbiana, una célula huésped procariota, una célula huésped bacteriana Gram negativa o una célula huésped de *E. coli*.

10 También se proporciona un procedimiento para producir una mezcla de (i) un agente insulínico o un fármaco incretina; y (ii) un agente insulínico o un fármaco incretina menos 2 aminoácidos en el extremo N del agente insulínico o fármaco incretina;

comprendiendo el procedimiento la etapa de expresar (i) en una célula huésped

15 usando una secuencia líder que da como resultado la escisión delante de la posición 1 y la escisión delante de la posición 3 del agente insulínico o fármaco incretina. El agente insulínico o un fármaco incretina puede estar en forma de una fusión o conjugado, por ejemplo, con un dAb que se une a albúmina sérica como se ha definido anteriormente. La invención también

20 proporciona mezclas obtenidas o que se pueden obtener mediante el procedimiento que se ha descrito anteriormente.

La secuencia líder puede ser ompA, ompT, GAS, o una cualquiera de las secuencias modificadas que se ha descrito anteriormente. El procedimiento puede comprender la etapa de producir la mezcla en una célula huésped

25 mediante expresión heteróloga. La célula huésped puede ser una célula

huésped microbiana, una célula huésped procariota, una célula huésped bacteriana Gram negativa o una célula huésped de *E. coli*.

Los agentes insulínotropicos y fármacos incretina tales como GLP-1 tienen una amplia diversidad de efectos terapéuticos, que pueden estar
5 mediados por el GLP-1R (tales como los que estimulan la secreción de insulina dependiente de glucosa a partir del páncreas). También se ha propuesto que hay una clase de efectos que pueden estar mediados por el producto de escisión de DPPIV, GLP-1 9-36amida (o GLP-1 9-37). El GLP-1 9-37 no es activo en la estimulación de la secreción de insulina sensible a glucosa a partir
10 del páncreas, pero se ha propuesto que tiene otros efectos biológicos, posiblemente por un mecanismo no dirigido por GLP-1R. Ya que la mayor parte de las aplicaciones clínicas hasta la fecha para la clase de moléculas GLP-1 se han dirigido a la diabetes a través de GLP-1R pancreático se ha introducido estabilidad a DPPIV en los péptidos, mediante el uso de un análogo de GLP-1
15 no humano, tal como Exendina-4, o mutando los aminoácidos 8 ó 9 en GLP-1 tal como se usa en Albiglutida (Syncria), o mediante modificaciones químicas o sintéticas en el extremo amino del péptido. Una estrategia adicional ha sido el bloqueo global de la actividad DPPIV usando inhibidores de DPPIV de molécula pequeña tales como vildagliptina (Galvus) y sitagliptina (Januvia), que
20 prolonga la semivida de cualquier GLP-1 secretado endógeno. Estas dos estrategias reducen de forma eficaz el nivel del metabolito de DPPIV GLP-1 9-36amida o GLP-1 9-37.

Sin embargo, se ha propuesto que el metabolito de DPPIV GLP-1 9-36amida o GLP-1 9-37 tiene un efecto biológico deseable. Varios estudios han
25 mostrado que el producto de escisión de DPPIV de GLP-1 7-36 amida,

concretamente GLP-1 9-36amida, que se forma rápidamente después de la secreción de GLP-1 7-36, y es más abundante en condiciones normales que GLP-1 7-37, puede tener un efecto biológico. Se han propuesto varias vías de acción diferentes para este mecanismo, como se enumeran a continuación:

- 5 GLP-1(9-37) es un antagonista en el GLP-1R; véase, por ejemplo: Eur J Pharmacol. 30 de dic de 1996; 318(2-3): 429-35.

El péptido similar a glucagón-1-(9-36) amida es un metabolito principal del péptido similar a glucagón-1-(7-36) amida después de administración *in vivo* a perros y actúa como un antagonista sobre el receptor pancreático (Knudsen
10 LB, Pridal L. J Biol Chem. 22 de agosto de 1997; 272(34): 21201-6) y antagonistas de potencia alta del receptor de péptido similar a glucagón-1 (Montrose-Rafizadeh C, Yang H, Rodgers BD, Beday A, Pritchette LA, Eng J. J Biol Chem. 22 de agosto de 1997; 272(34): 21201-6).

El GLP-1(9-37) señala por un mecanismo diferente a GLP-1(7-37), por
15 un mecanismo no dependiente de insulina: (Am J Physiol Endocrinol Metab. Abril de 2002; 282(4): E873-9.). GLP-1-(9-36) amida reduce la glucosa en sangre en cerdos anestesiados mediante un mecanismo que no implica la secreción de insulina (Deacon CF, Plamboeck A, Møller S, Holst JJ.).

O actuando aumentando la sensibilidad a insulina en individuos obesos:
20 (Obesity (Silver Spring). Julio de 2008; 16(7): 1501-9. Epub 17 de abril de 2008.

GLP-1 (9-36) amida, producto de escisión de GLP-1 (7-36) amida, es un péptido gluco regulador (Elahi D, Egan JM, Shannon RP, Meneilly GS, Khatri A, Habener JF, Andersen DK).

Esta actividad no se ha mostrado para la especie sin dos aminoácidos
25 de exendina, ya que esto no se forma como resultado de la escisión con

DPPIV, pero es posible que este también puede ser el caso para una especie
menos dos aminoácidos de exendina-4. La Exendina-4 también se ha
demostrado que trabaja mediante rutas dependientes e independientes de
GLP-1R en términos de efectos cardiacos y otros (Circulation. 2008; 117: 2340-
5 2350: Cardioprotective and Vasodilatory Actions of Glucagón-Like Peptide 1
Receptor Are Mediated Through Both Glucagón-Like Peptide 1 Receptor-
Dependent and -Independent Pathways Kiwon Ban, MSc; M. Hossein Noyan-
Ashraf, PhD; Judith Hoefer, MD; Steffen-Sebastian Bolz, MD, PhD; Daniel J.
Drucker, MD; Mansoor Husain, MD). Esto hace surgir la posibilidad de que, de
10 hecho, puede haber actividades similares y paralelas para las formas de
aminoácidos tanto de longitud completa como menos dos aminoácidos de
exendina.

Al menos dos rutas de procedimiento están disponibles para producir
mezclas de un agente insulínico o un fármaco incretina y las versiones de
15 menos dos aminoácidos. Por ejemplo, puede haber la producción separada de
un GLP-1 7-36amida de longitud completa (en formato de prolongación de
semivida deseado tal como un AlbuDAb), y el GLP-1 9-36amida (o proteína de
fusión deseada). Después, estos se podrían mezclar para dar un producto con
la proporción deseada de moléculas de GLP-1 7-36 y GLP-1 9-36. Se pueden
20 usar dos procedimientos paralelos de GMP para producir la mezcla de fármaco.

Un procedimiento alternativo es seleccionar una señal de secreción para
la cual la enzima de peptidasa señal, responsable de retirar la secuencia señal,
no tiene un único sitio de escisión sino que tiene más bien dos sitios de
escisión. Estos se cortan en una proporción definida por la señal de secreción
25 usada. Por tanto, dependiendo de la señal de secreción seleccionada, la

proporción producida puede ser:

- 100% de escisión delante de la posición 1 para dar GLP-1 7-36 (u otra molécula de longitud completa de agente insulínico o fármaco incretina); o escisión al 100% delante de la posición 3 para dar GLP-1 9-36 (u otra
- 5 secuencia menos dos aminoácidos de agente insulínico o fármaco incretina); o cualquier % entre el 0 y el 100 para cada una de las versiones de longitud completa o menos 2. Por ejemplo, la proporción podría ser:
- 90% de longitud completa: 10% menos 2 aminoácidos;
80% de longitud completa: 20% menos 2 aminoácidos;
10 75% de longitud completa: 25% menos 2 aminoácidos;
50% de longitud completa: 50% menos 2 aminoácidos;
25% de longitud completa: 75% menos 2 aminoácidos;
20% de longitud completa: 80% menos 2 aminoácidos; o
10% de longitud completa: 90% menos 2 aminoácidos.
- 15 La selección de la secuencia líder apropiada para producir la proporción deseada permitirá la producción a partir de una sola célula huésped. Esto es una ventaja clave en términos del procedimiento GMP. Esto permite el aprovechamiento de los efectos terapéuticos potenciales de ambas especies mientras que se conserva la estabilidad a enzimas endógenas.
- 20 También se procesa una variedad completa de otros péptidos y análogos endógenos por dipeptidasas aminotermiales, produciendo la molécula de longitud completa original y/o una especie susceptible a dipeptidasa. Por tanto, esta estrategia puede ser útil para la producción de cualquier péptido y proteína donde un único ciclo de fabricación puede producir
- 25 una mezcla definida de dos especies que difieren en longitud en unos pocos

aminoácidos, donde los diferentes aminoácidos comprenden parte de un sitio de reconocimiento para una peptidasa señal. La utilización de este procedimientos puede ser posible en células huésped de mamífero, eucariotas procariotas, por ejemplo en *E. coli*.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

Figura 1: es una ilustración de las secuencias de aminoácidos de (a) DAT0114 (SEC ID N°: 1), (b) DAT0115 (SEC ID N°: 2), (c) DAT0116 (SEC ID N°: 3), (d) DAT0117 (SEC ID N°: 4), (e) DAT0118 (SEC ID N°: 5), (f) DAT0119 (SEC ID N°: 6) (g) DAT0120 (SEC ID N°: 7) (h) DOM 7h-14 (SEC ID N°: 8)
10 (dAb) (las CDR están subrayadas), (i) GLP-1 7-37 A(8)G (SEC ID N°: 9), (j) exendina-4 (SEC ID N°: 10), (k) Engarce helicoidal (SEC ID N°: 11) (l) Engarce Gly-ser (SEC ID N°: 12), (m) DMS 7139 (SEC ID N°: 24, (n) DMS 7143 (SEC ID N°: 25) (o) DOM 7h-14-10 (SEC ID N°: 26) (dAb) (las CDR están subrayadas), (p) DOM 7h-11-15 (SEC ID N°: 27) (dAb) (las CDR están subrayadas) (q)
15 péptido señal OmpT AWA (líder) (SEC ID N°: 28) (r) DOM7h-14-10R108C (SEC ID N°: 42) (s) PYY 3-36 (con una lisina en la posición 10) (SEC ID N°: 43).

Figura 2: es una ilustración de las secuencias de ácido nucleico de: (a) DAT0114 (construcción de mamífero) (SEC ID N°: 13) , (b) DAT0115 (construcción de mamífero) (SEC ID N°: 14), (c) DAT0115 (construcción optimizada para *E. coli*) (SEC ID N°: 15), (d) DAT0116 (construcción de mamífero) (SEC ID N°: 16), (e) DAT0116 (construcción optimizada para *E. coli*) (SEC ID N°: 17), (f) DAT0117 (construcción de mamífero) (SEC ID N°: 18), (g) DAT0117 (construcción optimizada para *E. coli*) (SEC ID N°: 19), (h) DAT0118 (construcción de mamífero) (SEC ID N°: 20), (i) DAT0119 (construcción de
25 mamífero) (SEC ID N°: 21), (j) DAT0120 (construcción de mamífero) (SEC ID

Nº: 22), (k) Dom7h-14 (SEC ID Nº: 23) (l) DMS 7139 (SEC ID Nº: 29, (m) DMS 7143 (SEC ID Nº: 30) (n) Dom7h-14-10 (SEC ID Nº: 31) (dAb), (o) DOM7h-11-15 (SEC ID Nº: 32) (dAb) (p) péptido señal Omp AWA (SEC ID Nº: 33), (q) DOM 7h-14-10 R108C (dAb) (SEC ID Nº: 44), (r) ADNc de mono cynomolgus
5 SEC ID Nº: 45) (s) Oligonucleótido 1 (SEC ID Nº: 47), (t) Oligonucleótido 2 (SEC ID Nº: 48) (u) Secuencia de ácido nucleico de DMS 7139 para expresión en *E. coli* (SEC ID Nº: 50).

Figura 3: (a) muestra la reducción dependiente de la dosis del peso corporal en un modelo de obesidad de ratón administrando DAT0115 (b)
10 muestra consumo diario de alimento en un modelo de obesidad de ratón administrando DAT0115.

Figura 4: muestra un DSC de DAT0115: Línea continua – traza de DAT0115, línea discontinua – ajuste a un modelo que no es de 2 estados.

Figura 5: muestra DSC de Lisozima: Línea continua – traza de lisozima,
15 línea discontinua – ajuste a un modelo que no es de 2 estados (las trazas se superponen de tal forma que no se puede observar la traza discontinua).

La Figura 6 muestra SEC MALLS de DAT0115.

Figura 7: muestra SEC MALLS de DAT0117.

Figura 8: muestra SEC MALLS de DAT0120.

20 Figura 9: muestra las secuencias de aminoácidos del los líderes: (a) ompA (obtenido de *E. coli*) (SEC ID Nº: 34), (b) ompA-AMA (secuencia artificial) (SEC ID Nº: 35), (c) ompA-AWA (secuencia artificial) (SEC ID Nº: 36), (d) ompT (obtenido de *E. coli*) (SEC ID Nº: 37), (e) ompT-AMA (secuencia artificial) (SEC ID Nº: 38), (f) GAS (obtenido de *S. cerevisiae*) (SEC ID Nº: 39), (g) GAS-AMA (secuencia artificial) (SEC ID Nº: 40), (h) GAS-AWA (secuencia artificial) (SEC
25

ID N°: 41) (i) Pel B (*Erwinia carotovora*) (SEC ID N°: 46) (j) Mal E (secuencia artificial) (SEC ID N°: 49).

Figura 10: muestra DMS7139 purificado analizado por espectrometría de masas.

5 Figura 11: muestra una ilustración de la significación estadística de la disminución de glucosa sanguínea que incluye comparaciones entre DAT0115 y control, DMS7139 y control y entre DMS7139 y DAT0115, (a) muestra el diseño del estudio y (b) representación gráfica de ABC de glucosa. Los intervalos de confianza que no se solapan con la línea horizontal son
10 significativos.

Figura 12: muestra la dosis repetida de DMS7139 que muestra la disminución dependiente de dosis de HbA1c cuando se compara con control de DOM7h-14

Figura 13: muestra que DAT0115 y DMS7139 muestran reducción
15 dependiente de la dosis en el consumo de alimento y peso corporal en comparación con el control de DOM7h-14 en el modelo de obesidad de ratón DIO. En el gráfico, µg = microgramos.

Figura 14: muestra un conjugado peptídico que es:
Un AlbudAb DOM7h-14-10 (R108C) conjugado con un PYY3-36 amidado en el
20 extremo C por una lisina (introducida en la posición 10 de PYY) y un engarce de PEG de 4 repeticiones. La línea representa el engarce que está unido covalentemente a la cisteína C terminal libre del AlbudAb DOM7h-14-10 (R108C) y la lisina en la posición 10 de la secuencia de PYY. La secuencia de aminoácidos y estructura de este conjugado peptídico es la siguiente.

25 Figura 15: muestra que DMS7605 mostró una reducción dependiente de

la dosis en el peso corporal en comparación con el control de vehículo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En esta memoria descriptiva, la invención se ha descrito con referencia a realizaciones de un modo que permite que se escriba una memoria descriptiva clara y concisa. Se desea y se debe entender que las realizaciones se pueden
5 combinar o separar de forma diversa sin alejarse de la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido de forma común por el experto habitual en la materia (por
10 ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas convencionales para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase de forma general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel y col.,
15 Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. que se incorporan en este documento como referencia) y procedimientos químicos.

El término "agente insulínico" como se usa en este documento se refiere a un compuesto que es capaz de estimular o provocar la estimulación de la síntesis o expresión de o la actividad de la hormona insulina. Los
20 ejemplos conocidos de agentes insulínicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, glucosa, GIP, GLP, Exendina (por ejemplo, exendina-4 y exendina-3), PYY y OXM.

El término "incretina" como se usa en este documento se refiere a un tipo de hormona gastrointestinal que provoca un aumento en la cantidad de
25 insulina liberada cuando los niveles de glucosa son normales o particularmente

cuando están elevados. A modo de ejemplo, incluyen GLP-1, GIP, OXM, PYY (por ejemplo, PYY 3-36), VIP y PP (polipéptido pancreático).

El término "análogo" como se usa en este documento con referencia a un polipéptido quiere decir un péptido modificado en el que uno o más restos aminoacídicos del péptido se han sustituido por otros restos aminoacídicos y/o en el que uno o más restos aminoacídicos se han suprimido del péptido y/o en el que uno o más restos aminoacídicos se han suprimido del péptido y/o en el que uno o más restos aminoacídicos se han añadido al péptido. Tal adición o supresión de restos aminoacídicos puede tener lugar en el extremo N del péptido y/o en el extremo C del péptido o puede estar dentro del péptido. Se usa un sistema sencillo para describir análogos de GLP-1: por ejemplo, GLP-1 A8G (7-37 aminoácidos) indica un análogo de GLP-1 en el que la alanina de origen natural en la posición 8 se ha sustituido con un resto de glicina. Se dibujan fórmulas de análogos peptídicos y derivados de los mismos usando la abreviatura de una sola letra convencional para aminoácidos usada de acuerdo con la nomenclatura de IUPAC-IUB.

Como se usa en este documento "fragmento", cuando se usa en referencia a un polipéptido, es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que parte pero no toda la secuencia de aminoácidos del polipéptido de origen natural completo. Los fragmentos pueden ser "independientes" o estar comprendidos dentro de un polipéptido de mayor tamaño del cual forman una parte o región como una única región continua en un único polipéptido de mayor tamaño. A modo de ejemplo, un fragmento de GLP-1 de origen natural incluiría los aminoácidos 7 a 36 de los aminoácidos de origen natural 1 a 36. Además, los fragmentos de un

polipéptido también pueden ser variantes de la secuencia parcial de origen natural. Por ejemplo, un fragmento de GLP-1 que comprende los aminoácidos 7-30 de GLP-1 de origen natural también puede ser una variante que tiene sustituciones de aminoácidos dentro de su secuencia parcial.

5 Los ejemplos de agentes insulíntrópicos adecuados de la invención incluyen GLP-1, derivados de GLP-1, análogos de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1. Además, incluyen Exendina-4, análogos de Exendina-4 y derivados de Exendina-4 o fragmentos y Exendina-3, derivados de Exendina-3 y análogos de Exendina-3.

10 El término "GLP-1 " como se usa en este documento se refiere a GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) , GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-38), GLP-1 (7-39), GLP-1 (7-40), GLP-1 (7-41), un análogo de GLP-1, un péptido de GLP-1, un derivado o mutante o fragmento de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1. Tales péptidos, mutantes, análogos y derivados son agentes insulíntrópicos.

15 Por ejemplo, el GLP-1 puede ser mutante A8G de GLP-1 (7-37) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (i): SEC ID N°: 9.

 Se describen análogos adicionales de GLP-1 en la Solicitud de Patente Internacional N° 90/11296 (The General Hospital Corporation) que se refiere a fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-36) y derivados funcionales
20 de los mismos y tienen una actividad insulíntrópica que excede la actividad insulíntrópica de GLP-1 (1-36) o GLP-1 (1-37) y a su uso como agentes insulíntrópicos (incorporada en este documento como referencia, particularmente a modo de ejemplos de fármacos para uso en la presente invención).

25 La Solicitud de Patente Internacional N° WO 91/11457 (Buckley y col.)

describe análogos de los péptidos de GLP-1 activos 7-34, 7-35, 7-36 y 7-37 que también pueden ser útiles como fármacos GLP-1 de acuerdo con la presente invención.

El término "péptido exendina-4" como se usa en este documento se refiere a exendina-4 (1-39), un análogo de exendina-4, un fragmento de péptido exendina-4, un derivado de exendina-4 o un derivado de un análogo de exendina-4. Tales péptidos, fragmentos, análogos y derivados son agentes insulínotropicos. La secuencia de aminoácidos de exendina-4 (1-39) se muestra en la Figura 1 (j): SEC ID N°: 10.

Los análogos de Exendina adicionales que son útiles para la presente invención se describen en las publicaciones de patente 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) (todas se incorporan en este documento como referencia, particularmente a modo de ejemplos de fármacos para uso en la presente invención).

Como se usa en este documento, "péptido" se refiere a aproximadamente dos a aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos a través de enlaces peptídicos.

Como se usa en este documento, "polipéptido" se refiere a al menos aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos por enlaces pépticos. Los polipéptidos generalmente comprenden estructura terciaria y se pliegan en dominios funcionales.

Como se usa en este documento, "sistema de presentación" se refiere a un sistema en el que se puede acceder a una colección de polipéptidos o

péptidos para selección basándose en una característica deseada, tal como una característica física, química o funcional. El sistema de presentación puede ser un repertorio de polipéptidos o péptidos adecuado (por ejemplo, en una solución, inmovilizados sobre un soporte adecuado). El sistema de

5 presentación también puede ser un sistema que emplee un sistema de expresión celular (por ejemplo, expresión de una biblioteca de ácidos nucleicos en, por ejemplo, células transformadas, infectadas, transfectadas o transducidas y presentación de los polipéptidos codificados en la superficie de la célula) o un sistema de expresión acelular (por ejemplo,

10 compartimentalización y presentación en emulsión). Los sistemas de presentación ilustrativos unen la función codificante de un ácido nucleico y características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido codificado por el ácido nucleico. Cuando se emplea un sistema de presentación de este tipo, los polipéptidos o péptidos que tienen una característica física,

15 química y/o funcional deseada se pueden seleccionar y un ácido nucleico que codifica el polipéptido o péptido seleccionado se puede aislar o recuperar fácilmente. Se conocen en la técnica varios sistemas de presentación que unen la función codificante de un ácido nucleico y características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido, por ejemplo, presentación en

20 bacteriófago (presentación en fago, por ejemplo, presentación en fagémido), presentación en ribosoma, compartimentalización y presentación en emulsión, presentación en levadura, presentación en puromicina, presentación bacteriana, presentación en plásmido, presentación covalente y similares (véase, por ejemplo, el documento EP 0436597 (Dyax), la Patente de Estados

25 Unidos N° 6.172.197 (McCafferty y col.) y la Patente de Estados Unidos N°

6.489.103 (Griffiths y col.)).

Como se usa en este documento, "funcional" describe un polipéptido o péptido que tiene actividad biológica, tal como actividad de unión específica. Por ejemplo, el término "polipéptido funcional" incluye un anticuerpo o
5 fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno diana a través de su sitio de unión a antígeno.

Como se usa en este documento, "ligando diana" se refiere a un ligando que está unido específicamente o selectivamente mediante un polipéptido o péptido. Por ejemplo, cuando un polipéptido es un anticuerpo o un fragmento
10 de unión a antígeno del mismo, el ligando diana puede ser cualquier antígeno o epítoto deseado. La unión al antígeno diana depende de que el polipéptido o péptido sea funcional.

Como se usa en este documento un anticuerpo se refiere a IgG, IgM, IgA, IgD o IgE o un fragmento (tal como un Fab, F(ab')₂, Fv, Fv enlazado a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unido
15 a disulfuro, diacuerpo) bien sea obtenidos a partir de cualquier especie que produce de forma natural los anticuerpos o creados mediante tecnología de ADN recombinante; aislado bien sea a partir de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

20 Como se usa en este documento, "formato de anticuerpo" se refiere a cualquier estructura polipeptídica adecuada en la que se puede incorporar uno o más dominios variables de anticuerpo de manera de conferir especificidad de unión de antígeno en la estructura. Una diversidad de formatos de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica, tales como, anticuerpos quiméricos,
25 anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena única,

- anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de anticuerpo, fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo, Fv de cadena única (scFv), un Fv unido a disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un
- 5 (scFv), un Fv unido a disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dominio variable de anticuerpo único (por ejemplo, un dAb, V_H, V_{HH}, V_L) y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificadas mediante la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado o un V_{HH} humanizado).
- 10 La expresión "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H, V_{HH}, V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo- o hetero-multímero) con otras regiones variables o
- 15 dominios variables donde las otras regiones o dominios no son necesarias para la unión a antígeno mediante el dominio variable de inmunoglobulina único (es decir, donde el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable único de
- 20 inmunoglobulina" como se usa la expresión en este documento. Un "dominio variable de inmunoglobulina único" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" como se usa la expresión en este documento. Un "dominio variable de anticuerpo único" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" como se usa la expresión en este documento. Un dominio
- 25 variable único de inmunoglobulina es en una realización un dominio variable de

- anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo únicos de otras especies tales como dAb de V_{HH} de roedores (por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/29004, cuyo contenido se incorpora en este documento como referencia en su totalidad), de tiburón nodriza y de
- 5 *Camélidos*. Los V_{HH} de Camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se obtienen a partir de especies incluyendo camellos, llamas, alpaca, dromedario y guanaco, que produce anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Los V_{HH} se pueden humanizar.
- 10 Un "dominio" es una estructura de proteína plegada que tiene estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de propiedades funcionales específicas de proteínas y, en muchos casos se pueden añadir, retirar o transferir a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio
- 15 variable de anticuerpo único" es un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más bucles se han reemplazado por secuencias que no son características de dominios variables
- 20 de anticuerpo o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o que comprenden extensiones N o C terminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que conservan al menos la actividad y especificidad de unión del dominio de longitud completa.
- El término "biblioteca" se refiere a una mezcla de polipéptidos
- 25 heterogéneos o ácidos nucleicos. La biblioteca está compuesta de elementos,

cada uno de los cuales tiene una secuencia polipeptídica o de ácido nucleico única. Por lo tanto, "biblioteca" es sinónimo de "repertorio". Las diferencias de secuencia entre elementos de biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tener la forma de una mezcla
5 sencilla de polipéptidos o ácidos nucleicos o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo, células de bacterias, virus, animales o plantas y similares, transformadas con una biblioteca de ácidos nucleicos. En una realización, cada organismo individual o célula contiene sólo uno o un número limitado de elementos de biblioteca. En una realización, los ácidos
10 nucleicos se incorporan en vectores de expresión, para permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. Por lo tanto, en un aspecto una biblioteca puede tener la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un elemento único de la biblioteca en forma de ácido
15 nucleico que se puede expresar para producir su elemento polipeptídico correspondiente. Por tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un repertorio grande de diversos polipéptidos.

Como se usa en este documento, el término "dosis" se refiere a la cantidad de fusión o conjugado administrada a un sujeto toda al mismo tiempo
20 (dosis unitaria) o en dos o más administraciones a lo largo de un intervalo de tiempo definido. Por ejemplo, dosis se puede referir a la cantidad de fusión o conjugado administrada a un sujeto a lo largo del transcurso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas o uno o más meses (por ejemplo, mediante una administración única o mediante dos
25 o más administraciones). El intervalo entre dosis puede ser cualquier cantidad

de tiempo deseada.

El término "semivida", se refiere al tiempo que toma que la concentración de la fusión o conjugado en suero o plasma se reduzca en el 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a degradación y/o eliminación o secuestro mediante mecanismos naturales. Las fusiones o conjugados de la invención se estabilizan *in vivo* y su semivida se aumenta uniéndolos a moléculas de albúmina sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA) que resisten a la degradación y/o eliminación o secuestro. Estas moléculas de albúmina sérica son proteínas de origen natural que por sí mismas tienen una semivida larga *in vivo*. La semivida de una molécula está aumentada si su actividad funcional persiste, *in vivo*, durante un periodo más largo que una molécula similar que no es específica para la molécula que aumenta la semivida. Por ejemplo, una fusión o conjugado de la invención que comprende un dAb específico para albúmina sérica humana (HSA) y un fármaco incretina o agente insulínico tal como GLP-1 o exendina se compara con el mismo ligando en el que la especificidad por HSA no está presente, que no se une a HSA sino que se une a otra molécula. Por ejemplo, se puede unir a una tercera diana en la célula. Típicamente, la semivida se aumenta en el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50% o más. Los aumentos en el intervalo de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 100x, 200x, 300x o más de la semivida son posibles. Como alternativa o adicionalmente, son posibles los aumentos en el intervalo de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x, 200x, 300x, 400x de la semivida.

Como se usa en este documento "tamaño hidrodinámico" se refiere al tamaño aparente de una molécula (por ejemplo, una molécula de proteína, ligando) basándose en la difusión de la molécula a través de una solución

acuosa. La difusión o movimiento de una proteína a través de una solución se puede procesar para obtener un tamaño aparente de la proteína, donde el tamaño se proporciona mediante el "radio de Stoke" o "radio hidrodinámico" de la partícula de proteína. El "tamaño hidrodinámico" de una proteína depende
5 tanto de la masa como de la forma (conformación), de forma que dos proteínas que tienen la misma masa molecular pueden tener tamaños hidrodinámicos diferentes basándose en la conformación global de la proteína.

Los cálculos de "homología" o "identidad" o "similitud" entre dos secuencias (los términos se usan en este documento de forma intercambiable)
10 se realizan de la manera siguiente. Las secuencias se alinean con propósitos de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para alineamiento óptimo y se puede hacer caso omiso de las secuencias no homólogas con propósitos de comparación). En una realización,
15 la longitud de una secuencia de referencia alineada con propósitos de comparación es al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50% o al menos el 60% o al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los restos aminoacídicos o nucleótidos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótidos correspondientes después se
20 comparan. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto aminoacídico o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en este documento "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de
25 identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones

idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los alineamientos y homología, similitud o identidad de secuencia de aminoácidos o nucleótidos, como se
5 definen en este documento, se pueden preparar y determinar usando el algoritmo de Secuencias BLAST 2 usando parámetros por defecto (Tatusova, T. A. y col., *FEMS Microbiol Lett*, 174: 187-188 (1999)).

ÁCIDOS NUCLEICOS, CÉLULAS HUÉSPED:

La invención se refiere a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes
10 que codifican las fusiones de la invención que se describen en este documento, por ejemplo, las codificadas por las SEC ID N°: 13-23.

Los ácidos nucleicos denominados en este documento "aislados" son ácidos nucleicos que se han separado de otro material (por ejemplo, otros ácidos nucleicos tales como ADN genómico, ADNc y/o ARN) en su entorno
15 original (por ejemplo, en células o en una mezcla de ácidos nucleicos tal como una biblioteca). Un ácido nucleico aislado se puede aislar como parte de un vector (por ejemplo, un plásmido).

Los ácidos nucleicos denominados en este documento "recombinantes" son ácidos nucleicos que se han producido mediante metodología de ADN
20 recombinante, incluyendo procedimientos que dependen de recombinación artificial, tales como clonación en un vector o cromosoma usando, por ejemplo, enzimas de restricción, recombinación homóloga, virus y similares y ácidos nucleicos preparados usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La invención también se refiere a una célula huésped recombinante, por
25 ejemplo, de mamífero o microbiana que comprende un (uno o más) ácido

nucleico recombinante o construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una fusión de la invención como se ha descrito en este documento. También se proporciona un procedimiento para preparar una fusión de la invención como se ha descrito en este documento, que comprende

5 mantener a una célula huésped recombinante, por ejemplo, de mamífero o microbiana, de la invención en condiciones apropiadas para expresión del polipéptido de fusión. El procedimiento puede comprender además la etapa de aislar o recuperar la fusión, si se desea.

Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (es decir, una o más

10 moléculas de ácido nucleico) que codifica una polipéptido de fusión de la invención o una construcción de expresión (es decir, una o más construcciones) que comprende tal molécula o moléculas de ácido nucleico, se puede introducir en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante usando cualquier procedimiento apropiado para la

15 célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación o infección), de forma que la molécula o moléculas de ácido nucleico se unan operativamente a uno o más elementos de control de expresión (por ejemplo, en un vector, en una construcción creada por procedimientos en la célula, integrado en el genoma de la célula huésped). La

20 célula huésped recombinante resultante se puede mantener en condiciones adecuadas para expresión (por ejemplo, en presencia de un inductor, en un animal adecuado, en medio de cultivo adecuado complementado con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), mediante lo cual el péptido o polipéptido codificado se produce. Si se

25 desea, el péptido o polipéptido codificado se puede aislar o recuperar (por

ejemplo, del animal, de la célula huésped, del medio o de la leche). Este procedimiento abarca la expresión en una célula huésped de un animal transgénico (véase, por ejemplo, el documento WO 92/03918, GenPharm International).

- 5 Los polipéptidos de fusión de la invención descritos en este documento también se pueden producir en un sistema de expresión *in vitro* adecuado, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante cualquier otro procedimiento adecuado.

 Como se ha descrito e ilustrado en este documento, las fusiones o
10 conjugados de la invención generalmente se unen a albúmina sérica con afinidad elevada.

 Por ejemplo, las fusiones o conjugados de la invención se pueden unir a albúmina sérica humana con una afinidad (KD ; $KD = K_{off} (kd) / K_{on} (ka)$ [como se ha determinado mediante resonancia de plasmón superficial]) de
15 aproximadamente 5 micromolar a aproximadamente 100 pM, por ejemplo, aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 100 pM, por ejemplo, aproximadamente 5-50 nm, por ejemplo, aproximadamente 10-30 nm, por ejemplo, aproximadamente 20-30 nm.

 La fusión o conjugados de la invención se pueden expresar en especies
20 de *E. coli* o de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*) y también se pueden expresar en cualquier célula de levadura o fúngica. En una realización, la fusión se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 mg/l cuando se expresa en especies de *E. coli* o en *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*); o en cultivo de células de mamífero (por ejemplo, CHO o células HEK 293). Aunque
25 las fusiones o conjugados descritos en este documento se pueden secretar

cuando se expresan en especies de *E. coli* o en *Pichia* o en células de mamífero los mismos se pueden producir usando cualquier procedimiento adecuado, tal como procedimientos químicos sintéticos o procedimientos de producción biológica que no emplean especies de *E. coli* o *Pichia*.

- 5 En determinadas realizaciones, las fusiones y conjugados de la invención son eficaces en modelos animales de tales como los descritos en el documento WO 2006 /059106 (por ejemplo, en las páginas 104-105 del documento publicado WO 2006 /059106) o los descritos en los ejemplos en este documento, cuando se administra una cantidad eficaz. En general una
- 10 cantidad eficaz es de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1
- 15 mg/kg). Los expertos en la materia reconocen que los modelos de enfermedad son predictivos de la eficacia terapéutica en seres humanos.

- En general, las presentes fusiones y conjugados de la invención se utilizarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente o fisiológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos pueden incluir
- 20 soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, cualquiera incluyendo medios salinos y/o tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y Ringer lactado. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo
- 25 polipeptídico en suspensión, se pueden elegir entre espesantes tales como

carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes y reabastecedores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros
5 aditivos, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª Edición). Se puede usar una variedad de formulaciones adecuadas, incluyendo formulaciones de liberación prolongada.

La vía de administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo
10 con la invención puede ser cualquiera de aquellas comúnmente conocidas por los expertos en la materia. Para terapia, las fusiones o conjugados de fármaco de la invención se pueden administrar a cualquier paciente de acuerdo con técnicas convencionales.

La administración puede ser mediante cualquier modo apropiado,
15 incluyendo por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, oral, transdérmica, a través de la vía pulmonar o también, apropiadamente, mediante infusión directa con un catéter. La dosis y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y condición del paciente, administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros
20 parámetros que se tienen que tomar en cuenta por el médico. La administración puede ser local o sistémica según se indique.

En una realización, la invención proporciona una formulación pulmonar para administración al pulmón que comprende (a) los conjugados o fusiones de la invención y (b) un tampón farmacéuticamente aceptable y en la que la
25 composición comprende gotitas líquidas y aproximadamente el 40% o más, por

ejemplo, el 50% o más, de las gotitas líquidas presentes en la composición tienen un tamaño en el intervalo que es menor de aproximadamente 6 micrómetros, por ejemplo, de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 6 micrómetros, por ejemplo, menos de aproximadamente 5
5 micrómetros, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 micrómetros. Estas composiciones, por ejemplo, son especialmente adecuadas para administración a un sujeto mediante administración pulmonar local directa. Estas composiciones, por ejemplo, se pueden administrar directamente al pulmón, por ejemplo, mediante inhalación, por ejemplo usando un dispositivo
10 nebulizador. Estas composiciones para administración pulmonar pueden comprender un tampón fisiológicamente aceptable, que tiene un intervalo de pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5 y una viscosidad que es aproximadamente igual a la viscosidad de una solución de aproximadamente el
15 2% a aproximadamente el 10% de PEG 1000 en tampón fosfato 50 mM que contiene sacarosa al 1,2% (p/v)

Las fusiones o conjugados de esta invención se pueden liofilizar para almacenamiento y reconstituir en un vehículo adecuado antes del uso. Esta técnica ha demostrado que es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y
20 se pueden emplear las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en el campo. Los expertos en la materia apreciarán que la liofilización y reconstitución puede conducir a grados variables de pérdida de actividad de anticuerpo (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos de IgM tienden a tener una pérdida de actividad mayor que los anticuerpos de
25 IgG) y que los niveles de uso puede que tengan que ajustarse de forma

ascendente para compensar.

Para aplicaciones profilácticas, por ejemplo, cuando se administra a individuos con prediabetes o con resistencia a insulina, las composiciones que contienen las presentes fusiones o conjugados también se pueden administrar en dosis similares o ligeramente menores, para prevenir, inhibir o retrasar la aparición de la enfermedad (por ejemplo, para mantener la remisión o el reposo o para prevenir la fase aguda). El médico experto será capaz de determinar el intervalo de dosis apropiado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad. Cuando una fusión o conjugado de la invención se administra para tratar, suprimir o prevenir enfermedad, el mismo se puede administrar hasta cuatro veces por día, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses, en una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg).

El tratamiento o terapia realizados usando las composiciones descritas en este documento se considera "eficaz" si se reducen uno o más síntomas (por ejemplo, en al menos el 10% o al menos un punto en una escala de evaluación clínica), con relación a tales síntomas presentes antes del tratamiento o con relación a tales síntomas en un individuo (ser humano o modelo animal) no tratado con tal composición u otro control adecuado. Los síntomas obviamente variarán dependiendo de la naturaleza precisa de la enfermedad o trastorno al que se dirige, pero un médico o técnico experto de

forma ordinaria puede medirlo.

De forma similar, la profilaxis realizada usando una composición como se ha descrito en este documento es "eficaz" si la aparición o gravedad de uno o más síntomas se retrasan, reducen o suprimen con relación a tales síntomas en un individuo similar (ser humano o modelo animal) no tratado con la composición.

Las fusiones y conjugados de la presente invención se pueden usar como composiciones administradas por separado o se pueden administrar junto con otros agentes terapéuticos o activos, por ejemplo, otros polipéptidos o péptidos o moléculas pequeñas. Estos agentes adicionales pueden incluir diversos fármacos, tales como por ejemplo, metformina, insulina, glitazonas (por ejemplo, rosaglitazona), inmunosupresores e inmunoestimulantes.

Las fusiones y conjugados de la invención se pueden administrar y/o formular junto con uno o más agentes terapéuticos o activos adicionales. Cuando una fusión o conjugado de la invención se administra con un agente terapéutico adicional, la fusión o conjugado se puede administrar antes, simultáneamente, con o posteriormente a la administración del agente adicional. En general, la fusión o conjugado de la invención y el agente adicional se administran de una manera que proporciona un solapamiento del efecto terapéutico.

Semivida:

La semivida aumentada del agente insulínico o fármaco incretina, por ejemplo, el GLP-1 o ligando de exendina es útil en aplicaciones *in vivo*. La invención soluciona este problema proporcionando semivida aumentada del agente insulínico o fármaco incretina, por ejemplo, GLP y exendina, *in vivo*

y, por consiguiente, tiempos de persistencia mayores en el cuerpo de la actividad funcional de estas moléculas.

Como se ha descrito en este documento, las composiciones de la invención (es decir, que comprenden las fusiones o conjugados descritos en este documento) pueden tener semivida en suero o en plasma *in vivo* espectacularmente prolongada y/o ABC aumentada y/o tiempo de residencia media aumentado (TRM), en comparación con el agente insulínico o fármaco incretina en solitario. Además, la actividad del agente insulínico o fármaco incretina generalmente no se altera sustancialmente en la composición de la invención (por ejemplo, el conjugado o la fusión). Sin embargo, algún cambio en la actividad de composiciones de la invención en comparación con el agente insulínico o el fármaco incretina en solitario es aceptable y generalmente se compensa por las propiedades farmacocinéticas mejoradas de los conjugados o fusiones de la invención. Por ejemplo, los conjugados de fármaco o fusiones de la invención se pueden unir al fármaco diana con menor afinidad que el fármaco en solitario, pero tienen una eficacia aproximadamente equivalente o superior en comparación con el fármaco en solitario debido a las propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, semivida en suero *in vivo* prolongada, ABC mayor) de la composición de fármaco. Además, debido a la semivida aumentada los conjugados o fusiones de la invención se pueden administrar con menor frecuencia que el agente insulínico o fármaco incretina en solitario, por ejemplo, se pueden dar a los pacientes una vez al mes o una vez a la semana, y los mismos también consiguen un nivel más constante del agente insulínico o fármaco incretina en la sangre que la administración de agente insulínico o fármaco incretina en solitario,

consiguiendo de ese modo el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

- Los procedimientos para análisis farmacocinéticos y determinación de semivida de ligando serán familiares para los expertos en la materia. Los detalles se pueden encontrar en *Kenneth, A y col: Chemical Stability of*
- 5 *Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters y col, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª Rev. edición ex (1982), que describe parámetros farmacocinéticos tales como semividas de t alfa y t beta y área bajo la curva (ABC).
- 10 Las semividas ($t_{1/2}$ alfa y $t_{1/2}$ beta) y el ABC y TRM se pueden determinar a partir de una curva de concentración en plasma o suero de ligando frente a tiempo. El paquete de análisis WinNonlin (disponible en Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, EE.UU.) se puede usar, por ejemplo, para modelar la curva. En una primera fase (la fase alfa) el ligando está experimentando
- 15 principalmente distribución en el paciente, con alguna eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal cuando el ligando se ha distribuido y la concentración en suero está disminuyendo a medida que el ligando se elimina del paciente. La semivida t alfa es la semivida de la primera fase y la semivida t beta es la semivida de la segunda fase. Además, también se puede
- 20 usar un modelo de ajuste no compartimental que se conoce bien en la técnica para determinar la semivida.

- En una realización, la presente invención proporciona una fusión o conjugado de acuerdo con la invención que tiene una semivida de eliminación, por ejemplo, en sujetos humanos, en el intervalo de aproximadamente 12 horas
- 25 o más, por ejemplo, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 21 días,

por ejemplo, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 21 días, por ejemplo, aproximadamente 2-10 días, por ejemplo, aproximadamente 3-4 días.

Las fusiones o conjugados de la invención también se pueden formatear adicionalmente para tener un tamaño hidrodinámico mayor, por ejemplo, mediante unión de un grupo PEG, albúmina sérica, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción de unión a transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo o mediante conjugación a un dominio de anticuerpo.

El tamaño hidrodinámico se puede determinar usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de filtración en gel para determinar el tamaño hidrodinámico de un ligando. Las matrices de filtración en gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de ligandos, tales como matrices de agarosa reticulada, se conocen bien y están disponibles fácilmente.

Las composiciones de la invención, es decir, aquellas que comprenden las fusiones y conjugados descritos en este documento, proporcionan varias ventajas adicionales. El componente de anticuerpo de Dominio es muy estable, es pequeño con relación a anticuerpos y otros fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, se pueden producir en altos rendimientos mediante expresión en *E. coli* o levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*) y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen a albúmina sérica se pueden seleccionar fácilmente entre bibliotecas de origen humano o de cualquier especie deseada. Por consiguiente, las composiciones de la invención que comprenden el dAb que se une a albúmina sérica se pueden producir más fácilmente que los agentes terapéuticos que se producen generalmente en células de mamífero (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos) y se pueden

usar dAb que no son inmunogénicos (por ejemplo, se puede usar un dAb humano para tratar o diagnosticar enfermedades en seres humanos).

La inmunogenicidad del agente insulínico o fármaco incretina se puede reducir cuando el agente insulínico o incretina es parte de una
5 composición de fármaco que contiene un dAb que se une a albúmina sérica. Por consiguiente, la invención proporciona composiciones de fusión o conjugado que pueden ser menor inmunogénicas (que, por ejemplo, el agente insulínico o incretina en solitario) o que pueden ser sustancialmente no
10 inmunogénicas en el contexto de una composición de fármaco que contiene un dAb que se une a albúmina sérica. Por tanto, tales composiciones se pueden administrar a un sujeto de forma repetida a lo largo del tiempo con pérdida de eficacia mínima debido a la elaboración de anticuerpos anti-fármaco mediante el sistema inmune del sujeto.

Adicionalmente, las composiciones de conjugado o fusión descritas en
15 este documento pueden tener un perfil de seguridad mejorado y menor cantidad de efectos secundarios que el agente insulínico o incretina en solitario. Por ejemplo, como un resultado de la actividad de unión a albúmina sérica del dAb, las fusiones y conjugados de la invención tienen tiempo de residencia mejorado en la circulación vascular. Adicionalmente, las fusiones y
20 conjugados de la invención son sustancialmente incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica y de acumularse en el sistema nervioso central a continuación de la administración sistémica (por ejemplo, administración intravascular). Por consiguiente, las fusiones o conjugados de la invención se pueden administrar con mayor seguridad y efectos secundarios reducidos en
25 comparación con el agente insulínico o fármaco incretina en solitario. De

forma similar, las fusiones o conjugados pueden tener toxicidad reducida hacia órganos particulares (por ejemplo, riñón o hígado) en comparación con el fármaco en solitario.

EJEMPLOS:

- 5 **Ejemplo 1:** Expresión de fusiones genéticas de GLP-1 (A8G) o Exendina-4 y AlbudAb DOM7h-14:

Exendina-4 o GLP-1 (7-37), con alanina en la posición 8 reemplazada por glicina ([Gly⁸] GLP-1), se clonó en una fusión con DOM7h-14 (un anticuerpo de dominio (dAb) que se une a albúmina sérica (AlbudAb) con una secuencia
10 de aminoácidos mostrada más adelante) en el vector pTT-5 (obtenible en CNRC, Canadá). En cada caso el GLP-1 o exendina-4 estaba en el extremo 5' de la construcción y el dAb en el extremo 3'. En total se prepararon 7 construcciones (DAT0114, DAT 0115, DAT0116, DAT 0117, DAT 0118, DAT 0119 y DAT 0120) con las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura
15 1 (A-G). No había engarce, había un engarce gly-ser (G4S) o un engarce helicoidal (Arai, R., H. Ueda, y col. (2001). "Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein." Protein Eng 14(8): 529-32.456) o un engarce compuesto de un segundo resto de GLP-1 entre el GLP-1 o exendina-4 y el dAb. Los engarces se incluyeron como espaciadores
20 para separar el GLP-1 o exendina-4 espacialmente del dAb para evitar impedimento estérico de la unión entre el GLP-1 o exendina-4 y el receptor de GLP-1. Las secuencias de las construcciones se muestran en la Figura 1 (A-G).

Se preparó ADN sin endotoxina en *E. coli* usando lisis alcalina (usando el kit de plásmido sin endotoxina Giga, obtenible en Qiagen CA) y se usó para
25 transfectar células HEK293E (obtenibles en CNRC, Canadá). La transfección

fue en 250 ml/matraz de células HEK293E a $1,75 \times 10^6$ células/ml usando 333 μ l de 293 fectin (Invitrogen) y 250 μ g de ADN por matraz y la expresión fue a 30°C durante 5 días. El sobrenadante se recogió mediante centrifugación y la purificación fue mediante purificación por afinidad en proteína L. La proteína se unió de forma discontinua a la resina, se compactó en una columna y se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS. La proteína se eluyó con 50 ml de glicina 0,1 M pH 2 y se neutralizó con Tris pH 8. La proteína del tamaño esperado se identificó en un gel de SDS-PAGE y los tamaños se muestran en la tabla 1 más adelante.

10 **Tabla 1:** Pesos moleculares de DAT0114, DAT 0115, DAT0116, DAT 0117, DAT 0118, DAT 0119 y DAT 0120

Proteína de fusión	PM esperado
DAT0114	18256
DAT0115	16896
DAT0116	15950
DAT0117	19798
DAT0118	15936
DAT0119	15318
DAT0120	18895

Ejemplo 2: Demostración de que las fusiones de GLP-1 y exendina-4 AlbudAb se unen a albúmina sérica:

15 Se analizaron fusiones de GLP-1 y exendina-4 AlbudAb mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore AB obtenible en GE Healthcare) para obtener información de la afinidad. El análisis se realizó usando una

microplaca Biacore CM5 (matriz de dextrano carboximetilada) que estaba revestida con albúmina sérica. Aproximadamente 1000 unidades de resonancia (UR) de cada albúmina sérica que se tenía que ensayar (albúmina sérica humana, de rata y de ratón) se inmovilizaron en tampón acetato pH 5,5. La celda de flujo 1 del Biacore AB era un control negativo no revestido bloqueado, la celda de flujo 2 estaba revestida con albúmina sérica Humana (HSA) (815 UR), la celda de flujo 3 estaba revestida con albúmina sérica de rata (RSA) (826 UR) y la celda de flujo 4 estaba revestida con albúmina sérica de ratón (MSA) (938 UR). Cada molécula de fusión ensayada se expresó en cultivo de tejido de mamífero como se ha descrito en el ejemplo anterior.

Se preparó una variedad de concentraciones de la molécula de fusión (en el intervalo de 16 nM a 2 µM) mediante dilución en tampón BIACORE HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) y se fluyeron a través de la microplaca BIACORE.

La afinidad (KD) se calculó a partir de las trazas de BIACORE ajustando las curvas de asociación y de disociación de trazas generadas mediante concentraciones de dAb en la región de la KD. Las afinidades (KD) se resumen en la siguiente tabla 2:

Tabla 2: Unión de GLP-1 y exendina-4 AlbudAb a albúminas séricas humana, de rata y de ratón.

	fusión de GLP-1 (7-37) A8G, engarce helicoidal, DOM7h-14	fusión de 2xGLP-1 (7-37) A8G DOM7h-14
HSA	110 nM	150 nM
RSA	800 nM	700 nM
MSA	110 nM	130 nM

Los resultados anteriores demuestran que las moléculas de fusión conservan la capacidad de unirse a todos los tipos de albúmina sérica y esto indica que las mismas tienen probabilidad de tener una semivida extendida *in vivo*.

- 5 **Ejemplo 3:** Las fusiones de GLP-1 y exendina-4 AlbudAb son activas en un ensayo de unión a receptor de GLP-1 (GLP-1R BA):

Las fusiones se sometieron a intercambio de tampón en NaV1 100 mM, citrato 20 mM, pH 6,2. Mientras tanto, células CHO 6CRE GLP1R (células CHO K1 (obtenibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC)

10 transfectadas de forma estable con 6 elementos de respuesta para el AMPc que dirigen un gen informador de luciferasa y también con el receptor de GLP-1 humano) se sembraron a 2×10^5 células/ml en medios de suspensión. El cultivo de suspensión se mantuvo durante 24 horas. Después las células se diluyeron en tampón HEPES 15 mM (obtenible en Sigma), que contenía L glutamina 2

15 mM ($2,5 \times 10^5$ células/ml) y se dosificó en placas de 384 pocillos que contenían 10 µl/pocillo del compuesto que se tenía que ensayar. Después de la adición del control de ensayo, las placas se devolvieron a la incubadora durante 3 h a 37°C y CO₂ al 5%. Después de la incubación, se añadió sustrato steady glo luciferase (obtenible en Promega) a los pocillos como se describe en el kit y las

20 placas se sellaron con sellos de placa autoadhesivos (Weber Marking Systems Inc. N° de Cat. 607780). Las placas se colocaron en el lector (Viewlux, Perkin Elmer) y se preincubaron durante 5 minutos antes de leer la fluorescencia y la representación de los resultados. El compuesto se ensayó en una variedad de concentraciones en presencia y ausencia de albúmina 10 µM, permitiendo que

25 una curva de dosis respuesta se ajustara con y sin la albúmina. Las CE50 se

calcularon y se resumen en la siguiente tabla 3:

Tabla 3: Actividad de fusiones de GLP-1 y exendina-4 AlbuAb en un ensayo de unión a receptor de GLP-1 (GLP-1R BA)

	GLP-1R BA CE ₅₀ (pM) n=3	GLP-1R BA (albúmina 10 μM) CE ₅₀ (pM) n=2
Fusión de exendina 4 (G4S)3 DOM7h-14	8,9	35
Fusión de exendina 4 DOM7h-14	12	72
Fusión de exendina 4, engarce helicoidal, DOM7h-14	4,3	15
Fusión de GLP-1 A8G, engarce helicoidal, DOM7h-14	17	130
GLP-1 7-36	21	19
Exendina-4	1,0	0,82

- 5 Los resultados anteriores demuestran que todas las moléculas de fusión ensayadas conservan la potencia para unirse al receptor de GLP-1. Los resultados también demuestran que esta potencia se conserva en presencia de albúmina sérica. Por tanto, estas moléculas de fusión probablemente conserven la capacidad de unirse al receptor de GLP-1 *in vivo*.
- 10 **Ejemplo 4:** Expresión de DAT0115, DAT0116, DAT0117 y DAT0120 en cultivo de tejido de mamífero de HEK 293 seguido por purificación mediante captura por afinidad con proteína L y cromatografía de intercambio iónico:

El objetivo de este experimento era producir proteína para caracterización *in vivo* e *in vitro*. La proteína se expresó en cultivo de tejido de

mamífero en células HEK 293E del vector pTT-5 como se ha descrito previamente. En resumen, se preparó ADN sin endotoxina y se purificó y se usó para transfectar células HEK 293E. La expresión de proteínas fue durante 5 días a 30°C en una incubadora con agitación y los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante (que contenía la proteína de interés) se recogió. La proteína se purificó a partir del sobrenadante mediante captura por afinidad en resina de afinidad streamline de proteína L agarosa (resina GE Healthcare, proteína L acoplada internamente). Después la resina se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y después la proteína se eluyó con 5 volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH 2,0. La neutralización se realizó con 1 volumen de columna de Tris glicina 1 M pH 8,0. En este caso (al contrario del ejemplo anterior), se emprendió luego la purificación adicional. La proteína (en tris-glicina) se sometió a intercambio de tampón a acetato 20 mM, pH 5,0 antes de la carga usando el Akta en 1 columna (o 2 paralelas) de 6 ml resource S (GE healthcare) pre-equilibradas en acetato 20 mM pH 5,0. Después de lavar con el mismo tampón, la proteína se eluyó a través de un gradiente de NaCl 0-0,75 M o 0-1 M en acetato 20 mM pH 5,0. Las fracciones del tamaño correcto después se identificaron mediante electroforesis de SDS-PAGE y mediante espectrometría de masas y después se combinaron para preparar la muestra de proteína final. Después la proteína se sometió a intercambio de tampón en citrato 20 mM, pH 6,2, NaCl 100 mM y se concentró hasta entre 0,5 y 5 mg/ml. La proteína se filtró a través de un filtro de 0,2 µM para asegurar la esterilidad. Después la proteína se usó en los ejemplos descritos más adelante.

Ejemplo 5: Comparación de la estabilidad de DAT0115, DAT0116, DAT0117 y DAT0120 con 1, 3 y 6 ciclos de congelación/descongelación:

El objetivo de este estudio era comparar la estabilidad de DAT0115, DAT0116, DAT0117 y DAT0120 con 1, 3 y 6 ciclos de congelación/descongelación. Cada proteína se expresó en cultivo de tejido de mamífero en células HEK 293E a partir del vector pTT-5 y se purificó en resina de afinidad de proteína L seguido por cromatografía de intercambio iónico como se ha descrito anteriormente. La proteína se sometió a intercambio de tampón en citrato 20 mM, NaCl 100 mM y se diluyó hasta 0,5 mg/ml usando el mismo tampón. Alícuotas de 0,5 ml de cada proteína (en tubos eppendorf) después se sometieron a 0, 1, 3 ó 6 ciclos de congelación/descongelación, cada ciclo comprendiendo 3 minutos en hielo seco seguido por 2 minutos en un baño de agua a 37°C. Se observó durante el experimento que 2 minutos a 37°C eran suficientes para que la solución de proteína se descongelara por completo). Después de la finalización del número necesario de ciclos de congelación/descongelación, las muestras de proteína se almacenaron a 2-8°C hasta análisis posterior. Después las proteínas se sometieron a análisis mediante electroforesis en SDS-PAGE, ensayo de unión a GLP-1R, cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 75 y espectrometría de masas. Se observó que el perfil de SDS-PAGE, la potencia mediante GLP-1R BA y el perfil de espec. de masas de las cuatro proteínas no cambiaba significativamente de la línea basal en 1, 3 ó 6 ciclos de congelación/descongelación. La altura de pico máxima en el análisis de SEC tenía el 78%, el 86%, el 104% y el 57% de la altura máxima mantenida después de 6 ciclos de congelación/descongelación para DAT0115, DAT-116, DAT0117 y DAT0120 respectivamente. Se concluyó que DAT0120 era menos estable a los ciclos de congelación/descongelación que las otras tres proteínas.

Tabla 4: Resultados de comparación de la estabilidad de DAT0115, DAT0116, DAT0117 y DAT0120 con 1, 3 y 6 ciclos de congelación/descongelación

Muestra	Número de ciclos de congelación/descongelación	Altura de pico (mAU)	% de altura de pico máxima
DAT0115	0	49	100%
DAT0115	1	43	89%
DAT0115	3	40	82%
DAT0115	6	38	78%
DAT0116	0	29	100%
DAT0116	1	28	95%
DAT0116	3	26	91%
DAT0116	6	25	86%
DAT0117	0	34	100%
DAT0117	1	34	99%
DAT0117	3	35	103%
DAT0117	6	35	104%
DAT0120 0	0	35	100%
DAT0120 1	1	24	70%
DAT0120 3	3	21	59%
DAT0120 6	6	20	57%

Ejemplo 6: Demostración de la duración de acción de DAT0115 en el modelo de diabetes de tipo II de ratón db/db:

- El objetivo de este estudio era determinar la duración de acción de DAT0115 en la tolerancia a la glucosa oral en ratones db/db. Los animales se clasificaron mediante niveles de glucosa decrecientes tres días antes del inicio

del experimento y después se bloquearon. Un animal dentro de cada bloque se asignó después a cada uno de los 26 grupos de estudio. Esto aseguró un nivel de glucosa de partida medio similar en cada uno de los grupos de estudio.

Se administró DAT0115 (producido en células HEK293 y purificado como se ha descrito anteriormente) por vía subcutánea a 1 mg/kg, 0,3 mg/kg o 0,1 mg/kg 5 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h o 120 h antes de la carga de glucosa oral (no todas las dosis se administraron en cada punto de tiempo, véase la tabla más adelante para detalles). DAT0115 disminuyó de forma significativa el ABC de glucosa a lo largo del periodo de tiempo de 2 horas del ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en comparación con ratones db/db tratados con vehículo en momentos de tiempo fuera de e incluyendo 24 h para las dosis de 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg y fuera de e incluyendo el punto de tiempo de 72 h para la dosis de 1 mg/kg. Exendina-4, administrada como un control positivo a 42 µg/kg, también redujo significativamente el ABC de glucosa a continuación de OGTT cuando se administrada 5 h antes del bolo de glucosa oral. La tabla 5 más adelante muestra el porcentaje de reducción en ABC para cada uno de los grupos de estudio de DAT0115 en comparación con el vehículo. Un asterisco indica $P < 0,05$ para la comparación de DAT0115 con el vehículo usando la corrección de la tasa de descubrimiento falso.

Tabla 5: Muestra del porcentaje de reducción en ABC para cada uno de los grupos de estudio de DAT0115 en comparación con vehículo (un asterisco indica $P < 0,05$ para la comparación de DAT0115 con vehículo usando la corrección de la tasa de descubrimiento falso).

Tiempo de OGTT (h con relación a la dosis)	DAT0115 0,1 mg/kg	DAT0115 0,3 mg/kg	DAT0115 1 mg/kg
--	-------------------	-------------------	-----------------

Tiempo de OGTT (h con relación a la dosis)	DAT0115 0,1 mg/kg	DAT0115 0,3 mg/kg	DAT0115 1 mg/kg
+5	60%*	No realizado	76%*
+24	36%*	59%*	50%*
+48	28%	26%	37%*
+72	16%	26%	41%*
+96	-12%	No realizado	12%

Ejemplo 7: Demostración de eficacia de DAT0115 en el modelo de obesidad de ratones obesos inducidos por la dieta (DIO):

El objetivo de este estudio era usar un modelo de alimentación de ratón establecido (ratones obesos inducidos por la dieta) para determinar si el consumo de alimentos y, como un resultado, el peso corporal están afectados por el tratamiento con DAT0115. Esto puede ser predictivo para seres humanos. Ratones macho C57B1/6 (adquiridos en Taconic) se engordaron en una dieta irradiada alta en grasas al 60% de kcal durante 12 semanas y después se transfirieron a las instalaciones internas. Después de su llegada, los ratones se alojaron individualmente en camas alpha-dri en una habitación con temperatura y humedad controladas (70-72° F, Humedad = 48-50%, ciclo de luz de 5 AM/5 PM). La dieta se cambió a dieta alta en grasas al 45% y los animales se aclimataron durante 18 días. Antes de la administración del compuesto de ensayo, se inyectó a los ratones por vía subcutánea solución salina una vez al día durante tres días y se supervisó el consumo de alimentos. Los ratones se bloquearon y se agruparon de forma que el peso corporal y el consumo de alimentos no fueran diferentes entre o dentro de grupos. El día del

estudio, a grupos de 8 ratones se dosificaron por vía subcutánea de la forma siguiente usando un volumen de inyección de 5 ml/kg: Tres grupos se dosificaron con DAT0115 (dosis baja, media y alta), un grupo con una molécula de control negativo (AlbudAb DOM7h-14, pero sin conjugado de exendina-4) y uno con control positivo exendina-4.

Tabla 6: Protocolo para Establecer la Eficacia de DAT0115 en el modelo de obesidad de ratones inducidos por la dieta (DIO)

Grupo	Compuesto administrado	Nivel de dosis
1	Control negativo: DOM7h-14 en NaCl 100 mM, citrato/citrato de sodio 20 mM pH 6,2	1 mg/Kg
2	Exendina-4	0,01 mg/Kg
3	DAT0115 en NaCl 100 mM, citrato/citrato de sodio 20 mM pH 6,2	0,01 mg/Kg
4	DAT0115 en NaCl 100 mM, citrato/citrato de sodio 20 mM pH 6,2	0,1 mg/Kg
5	DAT0115 en NaCl 100 mM, citrato/citrato de sodio 20 mM pH 6,2	1 mg/Kg

El consumo diario de alimentos y el peso corporal se midieron diariamente durante 10 días. DAT0115 mostró una reducción dependiente de la dosis en el peso corporal y el consumo de alimentos en comparación con el control de DOM7h-14 (véanse las Figuras 3a y 3b). Por lo tanto, se concluyó que los datos de este estudio de ratón apoyan la hipótesis de que DAT0115 sería un buen candidato clínico.

Ejemplo 8: Determinación de la semivida en plasma de DAT0115, DAT0116 y

DAT0117 en un modelo de diabetes de tipo II de ratón:

El objetivo de este estudio era determinar un perfil de eliminación en plasma para DAT0115, DAT0116 y DAT0117 en un modelo de diabetes de tipo II de ratón (ratones db/db) y calcular los parámetros de PK a partir de los resultados. Se preparó proteína de DAT0115, DAT0116 y DAT0117 como se ha descrito anteriormente: en resumen, la proteína se expresó en cultivo de tejido de mamífero usando células HEK293E y se purificó usando absorción discontinua a resina de afinidad de proteína L-agarosa seguido por elución con glicina a pH 2,0 y neutralización con Tris pH 8,0. A continuación se realizó cromatografía de intercambio iónico en una columna Resource S usando un gradiente de sal de 0,1 M en acetato 20 mM pH 5,0. Las fracciones que contenían la proteína deseada después se combinaron y se sometieron a intercambio de tampón en NaCl 100 mM, citrato 20 mM, pH 6,2. La proteína se esterilizó con filtro, se sometió a intercambio de tampón y se retiró la endotoxina y se ensayó antes del uso *in vivo*.

A grupos de ratones db/db machos no sometidos a ayuno (ratones homocigotos LEPr db sin el receptor de leptina con mutaciones en el gen de receptor de leptina (*lepr*)) se dosificaron por vía subcutánea o por vía intravenosa 1 mg/kg de DAT0115, DAT0116 o DAT0117. En la predosis, 0,25, 0,5, 1, 4, 7, 12, 24, 36, 48 y 60 horas después de la dosificación para las dosis iv y la predosis 0,5, 1, 4, 7, 12, 24, 36, 48 y 60 horas después de la dosificación para las dosis sc se recogieron muestras de sangre mediante sangrado terminal y se preparó plasma. Las muestras de plasma se congelaron y posteriormente se descongelaron para análisis de los niveles de DAT0115, DAT0116 o DAT0117 según lo apropiado mediante extracción en fase sólida y

CL/EM/EM para detectar la presencia de un fragmento de la proteína (de la sección de exendina-4 de la proteína). Los niveles de plasma calculados después se usaron para ajustar parámetros farmacocinéticos usando software WinNonLin. La semivida después de la administración subcutánea e intravenosa y la biodisponibilidad se muestran en la tabla más adelante. A partir de los resultados se concluyó (véase la tabla 7 más adelante) que los tres compuestos muestran parámetros farmacocinéticos deseables en un modelo de diabetes de tipo II de ratón. Por lo tanto, estas moléculas muestran el potencial de buenos parámetros de PK en seres humanos diabéticos, favoreciendo este estudio la elección de DAT0115 o DAT0116 por encima de DAT0117.

Tabla 7: Semivida en plasma de DAT0115, DAT0116 y DAT0117 en un modelo de diabetes de tipo II de ratón

Compuesto	Semivida después de administración intravenosa	Semivida después de administración subcutánea	Biodisponibilidad
DAT0115	13,8	18,6	65%
DAT0116	14,3	20,1	61%
DAT0117	11,4	11,2	25%

Ejemplo 9: Determinación de la semivida en plasma de DAT0115, DAT0116 y DAT0117 en ratas:

El objetivo de este estudio era determinar un perfil de eliminación en

plasma para DAT0115, DAT0116 y DAT0117 en rata y calcular los parámetros de PK a partir de los resultados. Se preparó proteína DAT0115, DAT0116 y DAT0117 como se ha descrito anteriormente: en resumen, la proteína expresada en cultivo de tejido de mamífero usando células HEK293E y purificada usando absorción discontinua a resina de afinidad de proteína L-agarosa seguido por elución con glicina a pH 2,0 y neutralización con Tris pH 8,0. Esto se siguió por cromatografía de intercambio iónico en una columna Resource S usando un gradiente de sal 0-1 M en acetato 20 mM pH 5,0. Las fracciones que contienen la proteína deseada después se combinaron y se sometieron a intercambio de tampón en NaCl 100 mM, citrato 20 mM, pH 6,2. La proteína se esterilizó mediante filtración, se sometió a intercambio de tampón y QC antes de uso *in vivo*.

Para determinar la semivida en plasma, a grupos de 3 ratas se proporcionó una inyección única i.v o s.c a 0,3 mg/kg (iv) o 1,0 mg/kg (sc) de DAT0115, DAT0116 o DAT0117. Las muestras de plasma se obtuvieron mediante extracción de sangre en serie a partir de la vena de la cola durante un periodo de 72 h y se analizaron mediante CL/EM/EM para detectar la presencia de un fragmento de la fusión (a partir de la sección de exendina-4 de la fusión). Después, los niveles en plasma calculados se usaron para ajustar parámetros farmacocinéticos usando software WinNonLin. La semivida después de la administración subcutánea e intravenosa y la biodisponibilidad se muestra en la tabla 8 más adelante. Se concluyó a partir de los resultados que los tres compuestos muestran parámetros farmacocinéticos deseables en ratas. Por lo tanto, todas estas moléculas muestran el potencial de buenos parámetros de PK en seres humanos, favoreciendo este estudio la elección de DAT0115 por

encima de DAT0116 o DAT0117.

Tabla 8: Semivida después de administración subcutánea e intravenosa y biodisponibilidad

Compuesto	Semivida después de administración intravenosa	Semivida después de administración subcutánea	Biodisponibilidad
DAT0115	4,9 h	11,1 h	81%
DAT0116	4,1 h	8,7 h	32%
DAT0117	4,9 h	10,2 h	15%

Ejemplo 10: Determinación de semivida en plasma de DAT0115 en monos

5 cynomolgus:

El objetivo de este estudio era determinar los parámetros farmacocinéticos de DAT0115 en un primate no humano (mono cynomolgus) para posibilitar la llevada a escala alométrica de parámetros y proporcionar la mejor indicación posible de si era probable que DAT0115 tuviera un buen perfil de PK en seres humanos. La fusión de Exendina-4 AlbudAb de DAT0115 se expresó en células HEK293E en cultivo de tejido de mamífero y se purificó como se ha descrito anteriormente. En resumen, la proteína se purificó usando absorción discontinua a resina de afinidad de proteína L-agarosa seguido por elución con glicina a pH 2,0 y neutralización con Tris pH 8,0. Esto se continuó mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna Resource S usando un gradiente de sal de 0-1 M en acetato 20 mM pH 5,0. Las fracciones que contienen la proteína deseada después se combinaron y se sometieron a intercambio de tampón en NaCl 100 mM, citrato 20 mM pH 6,2.

10

15

La proteína se sometió a QC exhaustivamente (incluyendo SDS-PAGE, espec. de masas, ensayo de actividad: GLP-1R-BA, comprobación de pH, comprobación de osmolaridad), se esterilizó por filtración y se retiró la endotoxina. Después, la proteína con endotoxina baja confirmada (<0,05 EU/mg de proteína) se usó para el estudio *in vivo*.

Seis monos cynomolgus hembra (*Macaca fascicularis*; Charles River Laboratories BRF, Houston, TX, Primate Products, Miami, FL y/o Covance Research Products, Inc., Alice, TX) se usaron en este estudio. Los monos tenían aproximadamente 2 a 9 años de edad (con un intervalo de peso corporal de aproximadamente 2 a 5 kilogramos) al inicio de la dosificación. Los monos se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable en una habitación o habitaciones controladas ambientalmente (64°F a 84°F; del 30 al 70% de humedad relativa) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. A los monos hembra se ofrecieron aproximadamente 6 bizcochos dos veces al día de la Dieta de Mono N° 5038 (PMI Nutrition International, Richmond, IN) y una cuota diaria de fruta fresca. A cada animal se administró el compuesto de ensayo (DAT0115) por vía subcutánea o por vía intravenosa de acuerdo con el grupo de dosis (3 sc y 3 iv). La dosis fue a 0,1 mg/kg. En los días de dosificación, la primera alimentación ocurrió dentro de aproximadamente 1 hora después de la dosis para cada mono (extendiéndose hasta 2,5 horas después de la dosis si los procedimientos relacionados con el estudio requerían que los animales estuvieran fuera de su alojamiento local durante un periodo de tiempo prologando). La segunda alimentación fue no antes de 2 horas a continuación de la primera alimentación. Con el propósito del enriquecimiento del ambiente, se proporcionó fruta, legumbres y/o vegetales adicionales (por ejemplo, uvas,

zanahorias pequeñas, cacahuetes) a cada mono en o aproximadamente en el momento de comprobación de viabilidad o como un procedimiento de recompensa después de la aclimatación o procedimientos relacionados con el estudio. Agua corriente filtrada (suministrada por Aqua Pennsylvania, Inc. y
5 analizada periódicamente) estuvo disponible *ad libitum*.

Se recogieron muestras de plasma (aproximadamente 2 ml) a partir de los vasos femorales antes de la dosis (0 horas) y nominalmente a los cinco minutos (sólo el grupo iv), 0,5, 4, 8, 24, 48, 96, 144, 192, 288, 336, 504 y 672 horas después de la dosificación. (Las muestras de PK de uno de los animales
10 en el grupo de dosis iv sólo se recogieron a las 24 horas de forma que este animal se ha excluido del ajuste de PK). El análisis de las muestras se realizó mediante espectrometría de masas y el ajuste de los datos se realizó usando software de ajuste WinNonLin. Los parámetros de PK fueron los siguientes para administración iv (n=2): $T_{1/2}$ 67 h, MRT 46 h, V_z 327 ml/Kg y CI 3,3
15 ml/h/kg; y para administración sc (n=3): $T_{1/2}$ 68 h, MRT 98 h, V_z 306 ml/kg y CI 3,1 ml/h/Kg. La biodisponibilidad se calculó como el 99%.

Se concluyó a partir de este estudio (y a partir de los datos de unión de biacore a albúmina sérica de cyno y humana) que la semivida sc a las 68 h de DAT0115 en cyno (como se ha descrito anteriormente) proporciona la
20 confianza de que la semivida de la misma molécula en seres humanos probablemente sea suficientemente larga para correlacionarse con un requerimiento de dosis semanal (o menos frecuente).

Ejemplo 11: Determinación de PD de DAT0115 en monos cynomolgus:

Se condujo un estudio de PK en monos cynomolgus como se ha descrito
25 anteriormente. El principal objetivo de este estudio era determinar los

parámetros farmacocinéticos de DAT0115 en monos cynomolgus (como se ha descrito en el ejemplo anterior), pero un objetivo secundario era obtener un indicio de la eficacia del compuesto de DAT0115 en los monos (sin poder suficiente en el estudio de significación estadística). Para conseguir este

5 objetivo secundario, el consumo de bizcochos de los monos se supervisó durante el transcurso del estudio. Se observó en los días a continuación de la dosis que había una tendencia hacia la reducción en el consumo de alimentos en todos los monos. Se concluyó que esto probablemente se debía al efecto

10 del apetito. Por lo tanto, DAT0115 demuestra ser activo *in vivo*. Para asegurar el bienestar de los animales se consumieron frutas y golosinas la mayoría de los días a pesar del consumo de bizcocho.

Tabla 9: Medición de Bizcochos consumidos diariamente por monos cynomolgus (con dosificación de DAT0115 el día 1)

15

Dosis	Día-2	Día-1	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
0,1 mg/kg (iv)	12	12	6	3	9	12	12	12	12
0,1 mg/kg (iv)	12	12	0	1	0	4	6	10	11
0,1 mg/kg (iv)	12	12	0	0	0	0	1	6	6
0,1 mg/kg (sc)	12	12	5	0	4	11	7	11	12
0,1 mg/kg	12	12	12	0	2	12	12	12	12

38

Dosis	Día-2	Día-1	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
(sc)									
0,1 mg/kg	12	12	11	12	11	12	8	12	12
(sc)									

Ejemplo 12: La fusión de exendina-4 AlbudAb DAT0115 se une a albúmina sérica de rata, de mono cynomolgus y humana usando resonancia de plasmón superficial:

5 Se expresó y purificó DAT0115 y después se analizó mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore, GE Healthcare) para obtener información sobre afinidad. El análisis se realizó usando una microplaca de estreptavidina (SA) revestida con albúmina sérica biotinilada. 200-1000 unidades de resonancia (UR) de cada albúmina sérica se inmovilizaron en la

10 microplaca. La celda de flujo 1 no estaba revestida, la celda de flujo 2 estaba revestida con HSA, la celda de flujo 3 estaba revestida con RSA y la celda de flujo 4 estaba revestida con CSA. Se preparó un intervalo de concentraciones de fusión (en el intervalo de 15,6 nM a 2 µM mediante dilución en tampón BIACORE HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y

15 tensioactivo P20 al 0,005%) y se sometieron a flujo a través de la microplaca BIACORE.

 La afinidad (KD) se calculó a partir de las trazas de BIACORE ajustando las curvas de asociación y disociación a trazas generadas mediante concentraciones de dAb en la región de la KD. Las afinidades (KD) se resumen

20 en la siguiente tabla:

Tabla 10: Afinidad (KD) de DAT0115

Tipos de albúmina sérica	DAT0115
HSA	600 nM
RSA	2 μ M
CSA	2 μ M

Ejemplo 13: Caracterización de desnaturalización térmica de DAT0115 mediante Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC):

El objetivo de este experimento era supervisar la desnaturalización térmica de DAT0115 mediante DSC (Calorimetría de Exploración Diferencial) usando un microcalorímetro de celda capilar VP-DSC (Microcal) provisto de un inyector automático. La proteína se dializó durante una noche en citrato 20 mM, pH 6,2, NaCl 100 mM, se filtró y después se preparó a una concentración de 1 mg/ml según se determinó mediante absorbancia a 280 nm. Se usó tampón de diálisis filtrado como una referencia para todas las muestras. La DSC se realizó a una velocidad de calentamiento de 180°C/hora. Antes de cada muestra se inyectó una solución de decon al 1% y después tampón para limpiar las células y proporcionar una línea basal instrumental. Las trazas obtenidas se analizaron usando software Origin 7 Microcal. La traza de DSC obtenida a partir del tampón de referencia se restó de la traza de muestra. La concentración molar precisa de la muestra se usó para los cálculos (realizados automáticamente mediante Origin). El ajuste de línea basal para las regiones lineales de líneas basales tanto superior como inferior antes/después de la transición se seleccionaron y se conectaron usando la función cúbica de conexión. El gráfico resultante se ajusta a un modelo que no es de 2 estados, generando valores de T_m y $\Delta H/\Delta H_v$ aparentes.

La traza de DAT0115 se ajustó a un modelo de transición que no es de

dos estados, con appTm de $56,3^{\circ}\text{C}$. La calidad del ajuste fue satisfactoria (véase la Figura 4). La traza de control, lisozima, desarrollada usando el mismo equipo, produjo datos de buena calidad como se esperaba con ajuste perfecto (AppTm obtenida para lisozima fue $76,2^{\circ}\text{C}$ que está en concordancia con el

5 informado en la bibliografía (véase la Figura 5)). Por lo tanto, se concluyó que este experimento había proporcionado datos fiables que indicaban que DAT0115 es una molécula con una temperatura de fusión de $56,3^{\circ}\text{C}$ que es aceptable para un candidato clínico.

Ejemplo 14: Caracterización de DAT0115, DAT0117 y DAT0120 en estado de

10 solución mediante SEC MALLS:

El objetivo de este experimento era determinar el estado en solución de DAT0115, DAT0117 y DAT0120 mediante SEC MALLS. Las muestras se purificaron y dializaron en tampón apropiado (PBS) y se filtraron después de la diálisis, se determinó la concentración y se ajustó a 1 mg/ml. BSA y HSA se

15 adquirieron en Sigma y se usaron sin purificación adicional.

Detalles de instrumentación:

Sistema de HPLC Shimadzu LC-20AD Prominence con un auto-muestreador (SIL-20A) y un detector SPD-20A Prominence UV/Vis se conectó a un detector Wyatt Mini Dawn Treos (MALLS, detector de dispersión de luz

20 láser multiángulo) y Wyatt Optilab rEX DRI (índice refractivo diferencial). Los detectores se conectaron en el siguiente orden – LS-UV-RI. Los instrumentos tanto RI como LS funcionaron a una longitud de onda de 488 nm. Se usaron columnas TSK2000 (Tosoh corporation) o BioSep2000 (Phenomenex) (ambas son columnas de HPLC basadas en sílice con intervalo de separación similar,

25 1-300 kDa) con fase móvil de tampón fosfato 50 ó 200 mM (con o sin sal), pH

7,4 o 1xPBS. El caudal usado es 0,5 o 1 ml/min, el tiempo de desarrollo se ajustó para reflejar caudales diferentes (45 ó 23 min) y no se espera que tenga impacto significativo en la separación de las moléculas. Las proteínas se prepararon en PBS a una concentración de 1 mg/ml y el volumen de inyección fue 100 µl. El detector de dispersión de luz se calibró con tolueno de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La salida del detector UV y la salida del detector RI se conectaron al instrumento de dispersión de luz de forma que las señales de los tres detectores se pudieran recoger simultáneamente con el software Wyatt ASTRA. Varias inyecciones de BSA en una fase móvil de PBS (0,5 ó 1 ml/min) se desarrollan sobre una columna Tosoh TSK2000 recogiendo las señales de UV, LS y RI mediante el software Wyatt. Las trazas después se analizan usando software ASTRA y las señales se normalizan, alinean y corrigen para ensanchamiento de banda siguiendo las instrucciones del fabricante. Después las constantes de calibración se promedian y se aportan al molde que se usa para desarrollos de muestra futuros.

Cálculos de masa molar absoluta:

100 µl de 1 mg/ml de muestra se inyectaron en una columna pre-equilibrada apropiada. Después de columna SEC la muestra pasa a través de 3 detectores en línea, UV, MALLS (dispersión de luz láser multiángulo) y DRI (índice refractivo diferencial) permitiendo la determinación de masa molar absoluta. La dilución que tiene lugar en la columna es aproximadamente 10 veces, de forma que la concentración a la que se determina el estado en solución es 100 µg/ml de dAb o aproximadamente 8 µM.

La base de los cálculos en ASTRA así como la de la técnica de

representación Zimm, que con frecuencia se pone en práctica en un modo de muestra discontinuo es la ecuación de Zimm [*J. Chem. Phys.* **16**, 1093–1099 (1948)]:

$$\frac{R_{\theta}}{K^*c} = MP(\theta) - 2A_2cM^2P^2(\theta) \quad (\text{Ec. 1})$$

5 donde

- c es la concentración de masa de las moléculas de soluto en el disolvente (g/ml)
- M la masa molar promedio en peso (g/mol)
- A_2 es el segundo coeficiente virial (mol ml / g²)
- 10 • $K^* = 4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 l_0^{-4} N_A^{-1}$ es una constante óptica donde n_0 es el índice refractivo del disolvente en la longitud de onda de radiación incidente (vacío), l_0 es la longitud de onda de radiación incidente (vacío), expresada en nanómetros, N_A es el número de Avogadro igual a $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ y dn/dc es el aumento del índice refractivo diferencial de la solución disolvente-soluto con
15 respecto a un cambio en la concentración de soluto, expresado en ml/g (este factor se tiene que medir independientemente usando un detector dRI).
- $P(q)$ es el factor de forma obtenido teóricamente, aproximadamente igual a $1 - 2\mu^2 \langle r^2 \rangle / 3! + \dots$, donde $\mu = (4\pi / \lambda) \sin(\theta / 2)$, y $\langle r^2 \rangle$ es el radio cuadrado medio. $P(q)$ es una función del tamaño promedio z , la forma y la estructura de
20 las moléculas.
- R_q es la proporción de Rayleigh en exceso (cm⁻¹)

Esta ecuación asume luz incidente polarizada verticalmente y es válida para orden c^2 .

Para realizar los cálculos con el procedimiento de ajuste de Zimm, que
25 es un ajuste a R_q / K^*c frente a $\sin^2(q/2)$, es necesario expandir el recíproco de

Ec. 1 a primer orden en c:

Para realizar los cálculos con el procedimiento de ajuste de Zimm, que es un ajuste a Rq / K^*c frente a $\sin^2(\theta/2)$, es necesario expandir el recíproco de

Ec. 1 a primer orden en c:

$$5 \quad \frac{K^*c}{R_\theta} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2c \quad \text{Ec. 2}$$

Los resultados apropiados en este caso son:

$$M = \left(\frac{K^*c}{R_0} - 2A_2c \right)^{-1} \quad \text{Ec. 3}$$

y

$$\langle r^2 \rangle = \frac{3m_0^2 M}{16\pi^2} \quad \text{Ec. 4}$$

$$10 \quad \text{donde } m_0 \equiv d[K^*c / R_\theta] / d[\sin^2(\theta/2)]_{\theta \rightarrow 0} \quad \text{Ec. 5}$$

Los cálculos se realizaron automáticamente mediante software ASTRA, dando como resultado una representación con masa molar determinada para cada uno de las cortes [Astra manual].

15 La masa molar obtenida a partir de la representación para cada uno de los picos observados en el cromatograma se compara con la masa molecular esperada de una unidad única de la proteína. Esto permite extraer conclusiones acerca del estado en solución de la proteína.

Datos experimentales:

DAT0115

20 100 μ l de DAT0115 1 mg/ml se inyectaron en una columna Superdex 200, se equilibraron en citrato 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 6,2. La velocidad del flujo se ajustó a 0,5 ml/min. La proteína eluida en un pico único, con el Pm determinado a través de la anchura completa del pico como 17,4 kDa (Pm esperado para un monómero es 16,9 kDa). La eficacia de elución es el 100%.

Véase la Figura 6. (El control de HSA se comportó como se esperaba validando los resultados experimentales para DAT0115. El mismo se eluye en dos picos con Pm 64 kDa (monómero) y 110 kDa (dímero). El PM del dímero de HSA puede no ser muy preciso debido a una muy pequeña cantidad de

5 proteína dentro de este pico.)

DAT0117

100 µl de DAT0117 1 mg/ml se inyectaron en una columna TSK2000, equilibrada en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. La velocidad del flujo se ajustó a 1 ml/min. Aproximadamente el 50% de la cantidad inyectada de DAT0117 se

10 eluyó de la columna en dos picos solapantes con Pm aproximadamente de 35-45 kDa (dímero y superiores), lo cual indica una autoasociación marcada en las condiciones ensayadas aquí. (El control de BSA se comportó como se esperaba validando los resultados experimentales de DAT0117, dando dos picos con masa molar de 61 kDa y 146 kDa (monómero y dímero). Véase la

15 Figura 7 para los resultados de SEC Mal.

DAT0120

100 µl de DAT0120 1 mg/ml se inyectaron en una columna TSK2000, equilibrada en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. La velocidad del flujo se ajustó a 1 ml/min. Aproximadamente el 50% de la cantidad inyectada de DAT0120 se

20 eluyó de la columna de GF en un pico ligeramente asimétrico con Pm determinado a aproximadamente 25 kDa. Esto indica autoasociación de DAT0120 en las condiciones ensayadas aquí, la proteína parece estar en un equilibrio monómero-dímero rápido (el control de BSA se comportó como se esperaba validando los resultados experimentales de DAT0120,

25 proporcionando dos picos con masa molar de 61 kDa y 146 kDa (monómero y

dímero)). Véase la Figura 8 para los resultados SEC Mal.

A partir de estos experimentos anteriores se concluyó que DAT0115 demuestra autoasociación significativamente menor (y posiblemente ninguna) en las condiciones usadas aquí en comparación con las otras dos moléculas que muestran autoasociación significativa. El estado monomérico en solución puede ser preferible con respecto a la acción *in vivo* y el procedimiento aguas arriba y aguas abajo durante la fabricación de forma que DAT0115 puede ser la molécula más ideal para la progresión clínica con respecto al estado en solución.

Ejemplo 15: Purificación a partir de expresión en mamífero sin usar la proteína L de matriz de afinidad:

Tanto DAT0120 como DAT0115 se purificaron a partir de sobrenadantes de HEK 293. Cada proteína se expresó en cultivo de tejidos de mamífero en células HEK 293E a partir del vector pTT-5. Una columna de 1 ml de resina MEP Hypercel se equilibró con PBS, se lavó con Hidróxido de Sodio 0,1 M y después se re-equilibró con PBS. 200 ml del sobrenadante se aplicaron a la columna a 2,5 ml/min y después la columna se lavó con PBS y se eluyó con Glicina 0,1 M, pH 2.

Después de la elución la muestra se neutralizó mediante la adición de volumen de 1/5º de Tris 1 M, pH 8 y se almacenó a temperatura ambiente. La muestra mostró precipitación ligera después del almacenamiento y se filtró usando un dispositivo steriflip antes de desalar.

Dos columnas de desalación 26/10 HiPrep se equilibraron con Acetato de Sodio 20 mM, pH 5 (pH medido 5,3) a 10 ml/min, se limpiaron mediante la adición de NaOH 0,1 M y se re-equilibraron en Acetato de Sodio 20 mM, pH 5.

DAT0115 se desaló en Acetato de Sodio 20 mM, pH 5 antes de cargar en 1 ml de SPFF HiTrap equilibrado en Acetato de Sodio 20 mM, pH 5 (real 5,2). Después del lavado de la columna, la misma se sometió a un gradiente de 0-100% con Acetato de Sodio 20 mM, pH 5, NaCl 1 M y se recogieron 5 fracciones de elución con absorbancia por encima de 5 mAus y se analizaron mediante SDS-PAGE.

Después del almacenamiento de las fracciones SP FF durante una noche la muestra se filtró a 0,2 µm y se aplicó a columnas de desalación 2X26/10 HiPrep equilibradas en Citrato de Sodio 20 mM, pH 6,2, NaCl 100 mM. 10 La elución se concentró en un concentrador centrífugo de 20 ml, se esterilizó por filtración y se ensayó la endotoxina a diluciones 1/10 y 1/200.

La endotoxina se ensayó en dos diluciones, la dilución de 1/10 proporcionó un valor de 30 Eu/ml con una recuperación de punta de 250. El ensayo de 1/200 proporcionó un valor de <10,8 Eu/ml con una recuperación de 15 punta del 126%. La muestra se remitió para análisis de EM usando la ID 27823. Existen contaminantes de nivel bajo visibles por debajo del marcador de 80 kDa y entre los marcadores de 110-160 kDa en la carga elevada. La muestra parece ser más del 95% pura.

Ejemplo 16. Expresión y purificación de fusiones genéticas de Exendina-4 y 20 DOM7h-14-10/ DOM7h-11-15 AlbudAb.

El objetivo de este experimento era expresar eficazmente DMS7139 y DMS7143. DMS7139 es una fusión de exendina-4 con DOM7h-14-10 (un anticuerpo de dominio (dAb) que se une a albúmina sérica, también conocido como AlbudAb TM) y DMS7143 es una fusión de exendina-4 con DOM 7h-11- 25 15 (un anticuerpo dominio (dAb) que se une albúmina sérica, también conocido

como AlbudAb) en *E. coli* con extremos N procesados correctamente. Después la fusión se podría ensayar para determinar la actividad de la porción de exendina-4 y de la porción de AlbudAb en experimentos posteriores.

La exendina-4 se clonó como una fusión con DOM7h-14-10 o DOM7h-11-15, donde el péptido exendina-4 estaba en el extremo 5' de la construcción y AlbudAb en el extremo 3'. En total se prepararon dos construcciones cada una incluyendo engarce (Gly4Ser)₃ entre el péptido exendina-4 y el AlbudAb. El engarce se incluyó como un espaciador para separar la exendina 4 espacialmente de dAb para evitar el impedimento estérico de la unión entre exendina-4 y el receptor de GLP-1. Las secuencias de las construcciones se muestran en las Figuras 1(m) y 1(n). Para permitir la clonación en el vector de expresión, se produjeron fusiones como PCR de ensamblaje en el sitio de restricción NdeI en 5' seguido por péptido señal OmpT modificado (la secuencia de aminoácidos de OmpT AWA se muestra en la Figura 1(q) , SEC ID N° 28) y con sitio BamHI en el extremo 3'. El péptido señal OmpT AWA tiene los últimos tres codones cambiados del de tipo silvestre a "GCTTGGGCC" (mostrado en la Figura 2 (p): SEC ID N° 33) que codifica AWA en lugar de SFA. Ese cambio mejora el procesamiento en el sitio correcto mediante la peptidasa señal de *E. coli*.

Adicionalmente la secuencia de la fusión comienza inmediatamente después del sitio de escisión de peptidasa. Se ha introducido un sitio de digestión NcoI, que se solapa con el último codón del péptido señal y dos primeros aminoácidos de la secuencia de exendina-4. Este cambio facilita la subclonación posterior así como también conduce a la producción de la fusión con el extremo N terminal libre de exendina-4. Al vector de expresión pET12a

modificado (vectores pET obtenidos en EMD Biosciences) que comprende los cambios enumerados anteriormente se le dio el nombre pDOM35.

El vector y los PCR de ensamblaje se digirieron con endonucleasa de restricción NdeI y BamHI seguido por ligamiento del inserto en el vector usando un Kit de Ligamiento Rápido (NEB). 2 microlitros de este ligamiento se usaron para transformación de células MachI. Después del periodo de cultivo de recuperación, las células se sembraron en placas de agar que contenían carbenicilina y se incubaron a 37°C durante una noche. Las colonias se secuenciaron y aquellas que contenían la secuencia correcta se usaron para propagación y aislamiento de plásmido (Plasmid Mini Prep kit, Qiagen). Células BL21(DE3) se transformaron con ADN plasmídico y la colonias resultantes se usaron para inoculación del cultivo de expresión. La expresión se realizó mediante inoculación de un cultivo de 4 x 0,5 litros de medio TB Onex (complementado con soluciones de autoinducción Overnight Express™), 1 gotita de antiespumante y 100 microgramos por mililitro de carbenicilina. El cultivo se incubó durante 3 noches a 30°C con agitación a 250 rpm y después el sobrenadante de cultivo se clarificó mediante centrifugación a 3700 xg durante 1 hora. La proteína expresada después se purificó a partir del sobrenadante clarificado usando proteína L streamline (GE Healthcare, N° de Cat. 28-4058-03, acoplada a proteína L) y se eluyó a partir de la Proteína L usando glicina 0,1 M pH 2,0, después se neutralizó usando 0,1 volumen de Tris 1 M pH 8,0. A continuación, la proteína se concentró y dializó a Tampón A (acetato de sodio-ácido acético 20 mM pH 5,0) y se purificó mediante Cromatografía de Intercambio Iónico en el AktaXpress (GE healthcare). Se cargó proteína en una columna de 6 ml Resource S en Tampón A (tampón sin

sal) y después se eluyó con gradiente de Tampón B (acetato de sodio-ácido acético 20 mM, pH 5,0, NaCl 1 M) del 0-68% B en 65 minutos en fracciones (para DMS7139). Las fracciones se analizaron en SDS-PAGE y mediante Espectrometría de Masas y se agruparon aquellos de la masa correcta. La
5 proteína final se dializó en tampón citrato 20 mM, NaCl 0,1 M y la identidad se reconfirmó mediante SDS-PAGE y Espectrometría de Masas.

Ejemplo 17. Las fusiones de Exendina-4 AlbudAb DMS7139 y DMS7143 se unen a albúmina sérica usando resonancia de plasmón superficial.

DMS7139 y DMS7143 se expresaron y purificaron como se ha descrito
10 anteriormente y se analizaron mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore, GE Healthcare) para obtener información sobre la afinidad. El análisis se realizó usando 2 microplacas CM5 (matriz de dextrano carboximetilado) que estaban revestidas con albúmina sérica. ~500 unidades de resonancia (UR) de cada albúmina sérica se inmovilizaron en tampón acetato pH 4,5. La primera
15 microplaca tenía la celda de flujo 1 no revestida y bloqueada y la celda de flujo 2 estaba revestida con MSA (560 UR). La segunda microplaca tenía la celda de flujo 1 no revestida y bloqueada, la celda de flujo 2 estaba revestida con HSA, la celda de flujo 3 estaba revestida con CSA y la celda de flujo 4 estaba revestida con RSA. Para todas las albúminas séricas, el objetivo era revestir en
20 la región de 350 UR de proteína en la microplaca.

Se preparó un intervalo de concentraciones de fusión (en el intervalo de 55 nM a 1 μ M para DMS7139 y 24 nM a 4,4 μ M para DMS7143) mediante dilución en tampón BIACORE HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) y se hizo fluir a través de la
25 microplaca BIACORE. La afinidad (KD) se calculó a partir de las trazas de

BIACORE ajustando las curvas de asociación y disociación a trazas generadas mediante concentraciones de dAb en la región de KD. Las afinidades (KD) se resumen en la siguiente tabla 11:

Tabla 11:

	DMS7139 (M)	DMS7143 (M)
HSA	2,69E-08	1,48E-08
RSA	3,15E-08	2,19E-07
CSA	4,23E-08	3,89E-08
MSA	7,37E-08	8,93E-08

5

Se concluyó que DMS7139 y DMS7143 tienen afinidad por albúmina sérica (con excepción de afinidad de DMS7143 por RSA) que está en el intervalo de 10-90 nM. Esto es significativamente más elevado que la afinidad por SA de fusiones previas (por ejemplo, DAT0115 que es la exendina-4
10 enlazada al AlbuAb DOM7h-14 con un engarce de glicina serina que tiene afinidades por estas albúminas séricas en el intervalo de los 100 nM). La afinidad más elevada de las fusiones nuevas (por la albúmina sérica) probablemente se traduzca en semividas en plasma *in vivo* más largas lo cual significará que las fusiones será capaces de administrarse menos
15 frecuentemente para la misma eficacia y/o mantener un nivel más constante de fármaco en el plasma en el tiempo reduciendo potencialmente la toxicidad relacionada con cMáx no deseada o efectos secundarios.

Ejemplo 18

Las fusiones DMS7139 y DMS7143 son activas en el ensayo de unión a
20 receptor de GLP-1

GLP-1R es un receptor acoplado a proteína G 7TM que, para los propósitos de este ensayo, se expresa en células CHO. La activación del receptor mediante GLP-1 o análogos conduce a la conversión de ATP en AMPc mediante la adenilato ciclasa que está acoplada al receptor. Las células CHO se transfectan de forma estable con el gen informador 6CRE/luc. Por lo tanto, en la producción de AMPc a continuación de la activación con GLP-1 del receptor, el gen promotor (que contiene 6 copias de elemento de respuesta para el AMPc - 6CRE) activa la expresión del gen informador de luciferasa. Después esto cataliza una reacción con luciferina para producir luz que se puede medir en un luminómetro.

Procedimiento

Células CHO 6CRE GLP1R se descongelaron rápidamente sumergiendo a la mitad el vial o los viales en un baño de agua a 37°C, y los contenidos del vial o los viales se transfirieron a un tubo falcon de 50 ml y se añadieron 10 ml de medio de ensayo RPMI (sin rojo fenol) (*Sigma, N° de Cat. R7509*) + L-glutamina 2 mM (*Gibco, N° de Cat. 25030*) + HEPES 15 mM (*Sigma, N° de Cat. H0887*) por vial. Después de recuento y centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos las células se resuspendieron en el volumen apropiado de medio de ensayo RPMI para proporcionar 1×10^6 células por ml y se dosificaron 50 µl en cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos blanca (*placa de cultivo de tejido de 96 pocillos Costar estéril blanca N° de Cat. 3917*). Las células se incubaron durante una noche a 37°C/CO2 al 5%. Al día siguiente las células se retiraron de la incubadora y se añadieron 50 µl del control/muestra preparado previamente a los pocillos y la placa se devolvió a la incubadora durante 3 horas a 37°C y CO2 al 5%.

Preparación de control de Exendina-4 (Sigma, N° de cat. E7144)

En una placa de 96 pocillos de fondo en V añadir 2 µl de 1 mg/ml) de Exendina-4 a 198 µl de medio de ensayo RPMI para producir una solución 2,39 µM. Añadir 2 µl de la solución 2,39 µM a 237 µl de medio de ensayo RPMI para producir una solución 20 nM (para una concentración final en el ensayo de 10 nM). Diluir en serie el control 1:10 hacia abajo en la placa (15 µl de control + 135 µl de medio de ensayo RPMI) para generar una curva de 8 puntos.

Preparación de muestras desconocidas

Usar las mismas directrices para la preparación del control para la preparación de las muestras desconocidas. Hacer que la concentración superior sea el doble de la concentración de ensayo final necesaria y diluir 1:10 hacia abajo en la placa.

Preparación de luciferasa (Promega, N° de cat E2620)

Retirar el número necesario de alícuotas de luciferasa Bright-Glo del congelador y permitir el descongelamiento a TA en la oscuridad. Un vial de 5 ml es suficiente para una placa de ensayo.

Después del tiempo de incubación se añadieron 50 µl del reactivo de Luciferasa Bright-Glo a todos los pocillos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 3 min para permitir que ocurriera la lisis de las células. La luminiscencia (recuentos por segundo) se leyó usando el lector de microplacas M5e leyendo cada pocillo durante 0,1 s. El CPS de los pocillos de fondo que contenían sólo células, se restó de todos los demás pocillos. Los pocillos de control (GLP-1(7-36) o Exendina-4) deberían mostrar estimulación máxima en las concentraciones más altas. Las curvas de efecto de concentración de las muestras desconocidas se ajustan a partir de lo cual se calcula la CE50 con el

uso de software GraphPad Prism o ExcelFit.

Las dos fusiones de exendina-4 AlbuAb (DMS7139 y DMS7143) se ensayaron en el ensayo para determinar la actividad en el GLP-1R BA uno al lado del otro con exendina-4. Los resultados están en la tabla 12 más adelante:

5 **Tabla 12:**

	GLP-1R BA CE ₅₀ (pM)	GLP-1R BA (albúmina 10 µM) CE ₅₀ (pM)
DMS7139	265,1	1488
DMS7143	186,8	871,1
Exendina 4	72,18	No realizado
Control de DAT0115	211,8	607,6

Se concluyó a partir de los resultados anteriores que DMS7139 y DMS7143 presentan la actividad esperada en el GLP-1R BA y, por lo tanto, es probable que los mismos sean activos frente al receptor de GLP-1 *in vivo*. Por lo tanto, DMS7139 y DMS7143 son buenos candidatos para investigación preclínica adicional con miras a moverlos hacia la clínica si esto es satisfactorio.

Ejemplo 19

El vector que expresa DAT0115 o DAT0117 se transformó en la cepa de *E. coli* BI21-(DE3) (Novagen). Un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio terrific broth modificado (Sigma N° de cat. T0918) se inoculó a una DO = 0,1 y después se cultivó a 30°C complementado con 50 mg/l de kanamicina. A A₆₀₀ = 0,5-1 células se indujeron con IPTG hasta una concentración final de 50 µM y el cultivo se continuo a la misma temperatura durante una noche. El

cultivo se centrifugó y DAT0115 o DAT0117 se sacaron del sobrenadante de cultivo usando la resina de Proteína L (elaborada internamente). La unión discontinua se produjo durante una noche a 8°C, la resina se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y DAT0115 o DAT0117 se eluyó de la resina con 3 volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH = 2. La proteína se neutralizó añadiendo 1/5 del volumen de Tris 1 M pH 8,0. La proteína después se analizó mediante gel-SDS y espectrometría de masas (EM) o mediante degradación de Edman (Edman).

Los vectores que expresan DAT0117 que están marcados con un asterisco (*) se transformaron, cultivaron y analizaron usando las condiciones expuestas en el Ejemplo 16.

Tabla 13:

Nombre de líder	Construcción	% de EM de longitud completa (Edman)	% de EM menos dos aminoácidos (Edman)
OmpA	DAT0115	77%	23%
OmpA-AMA	DAT0115	100%	0%
OmpA-AWA	DAT0115	84%	16%
OmpT	DAT0117 *	46% (42%)	54% (58%)
	DAT0117	41%	59%
OmpT-AMA	DAT0117*	86% (83%)	14% (17%)
OmpT-AWA	DAT0117*	100% (100%)	0% (0%)
GAS	DAT0117	13%	87%
GAS-AMA	DAT0115	72%	28%

Ejemplo 20 Expresión y purificación de AlbudAb DMS7139 (unas fusiones

genéticas de exendina-4 y DOM7h14-10) usando el vector Male/pET30

El gen de DMS7139 se amplificó por PCR a partir de un plásmido que contenía DMS7139 usando el oligonucleótido N° 1 (Figura 2 s: SEC ID N° 47) (GGAATTCCATATGAAAATCAAAACCGGTGCTCGCATCCTGGCTCTGTCCG
5 CTCTGACCACTATGATGTTCTCCGCTTCCGCGCTGGCTCATGGTGAAGGA
ACATTTACCAGTGAC) y oligonucleótido N° 2
GTTTCAGAATTCTTATTACCGTTTGATTTCACCTTGGTCCCTTG (Figura 2 t: SEC ID N° 48). El producto de amplificación contiene la construcción de DMS7139 con una secuencia señal Male N terminal
10 MKIKTGARILALSALTTMMFSASALA (Figura 9 j: SEC ID N° 49) y deja en sus extremos 5' y 3' la secuencia de reconocimiento para *NdeI* y *EcoRI*, respectivamente. Los fragmentos génicos resultantes se digirieron con *NdeI/EcoRI*, y se ligaron en el vector pET30 digerido con *NdeI/EcoRI* (Invitrogen). Para verificar el inserto los clones se secuenciaron usando los
15 cebadores directo T7 e inverso T7.

El vector que expresa el DMS7139 se transformó en la cepa de *E. coli* BL21-(DE3) (Novagen) que contiene el vector pECO-pgl (véase Aon y col., applied and environmental microbiology feb. 2008 vol.74, N° 2, págs. 950-958) y los cultivos se cultivaron a 30°C en medio mínimo (véase Korz D.J. y col J. Biotechnol. 1995 39 págs. 59-65.) complementado con 50 mg/l de kanamicina y
20 37,5 mg/l de cloramfenicol. A una A_{600} entre 0,25 y 0,5, las células (valor real obtenido 0,347) se indujeron con IPTG a una concentración final de 70 μ M y el cultivo se continuó a 28°C durante una noche. El cultivo se centrifugó y DMS7139 se sacó del sobrenadante de cultivo usando la resina Proteína L
25 (elaborada internamente). La unión discontinua ocurrió durante la noche a 4°C,

la resina se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y DMS7139 se eluyó de la resina con tres volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH = 2. La proteína después se analizó mediante gel-SDS y espectrometría de masas. Como se muestra en la Figura 10 la espectrometría de masas muestra que
5 existe DMS7139 muy puro.

La secuencia del ADN que codifica la proteína DMS7139 también se puede optimizar por codón para expresión en *E. coli* y esta secuencia se muestra en la Figura 2(u) SEC ID N° 50.

Ejemplo 21 DMS7139 se une al GLP-1R de ratón, rata, mono cynomolgus y humano con potencia similar
10

Para determinar la potencia relativa de DMS7139 en el GLP-1R humano, de ratón, de rata y de mono cynomolgus, se usó un bioensayo de GLP-1R funcional de melanóforo (similar a Jayawickreme y col., Curr Protocols in Pharmacol. 2005). La translocación de melanosoma a través de la activación
15 de 7TM se ha documentado bastante y las proteínas G residentes dentro de las células de melanóforo han demostrado acoplarse a GPCR de una manera similar a los sistemas de células de mamífero (Gross y col., J Cell Biol 2002; 156:855-865). Este bioensayo usa una línea de células de melanóforo, obtenida a partir de células de la piel de la rana *Xenopus laevis*, que posee
20 organelas que contienen pigmento oscuro (melanina) conocidas como melanosomas (Lerner, Trends Neurosci. 1994; 17: 142-146). Los cambios en el nivel de AMPc intracelular controlan el alcance al que se agregan o dispersan los melanosomas por toda la célula y, por tanto, la densidad de color de las células de melanóforos está relacionada directamente con los niveles de AMPc.
25 Los detalles adicionales se proporcionan más adelante.

Los ADNc de fase de lectura abierta de longitud completa que codifican receptores de GLP-1 de rata, de ratón y humano se clonaron en el vector de expresión pJG3.6 o pcDNA3 usando técnicas de biología molecular convencionales. Los números de acceso de Genebank se muestran más
5 adelante en la Tabla 14.

Tabla 14 Números de referencia de Genebank

GLP1R	Genebank
rata	NM_012728
ratón	NM_021332
humano	NM_002062

El clon que codifica el GLP-1R de mono cynomolgus se amplificó a partir de ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN total aislado de pulmón, hígado y cerebro de mono cynomolgus y se subclonó en pcDNA3.2DGW. Se
10 confirmó la secuencia de ADNc de longitud completa. Los melanóforos se mantuvieron en matraces T225 (Costar N° de Cat. 3000) en medio L-15 a 27°C y CO₂ al 0% y separaron una vez a la semana (1:10) a partir de un matraz confluyente con 0,7x de tripsina seguido por alimentación dos veces a la semana. El ADNc de mono cynomolgus se muestra en la Figura 2 (r) (SEC ID
15 N° 45).

Con propósitos de ensayo las células se lavaron, se trataron con tripsina y se resuspendieron en 0,7x EPG PBS a una concentración de 15×10^6 células por ml. 800 µl de células se mezclaron suavemente con 20-40 µg de ADNc y se incubaron en hielo durante 20 minutos. A continuación de la incubación, 800 µl
20 de mezcla de células/ADNc se pipetearon en una cubeta y se sometieron a electroporación a 500V, 725 uF y 950 ohms. Después las células se

108

transfirieron desde la cubeta directamente a un matraz T75 que contenía RFM (medio de rana regular) y se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y después durante una noche en una incubadora (25°C, CO₂ al 0%). Al día siguiente, las células se trataron con tripsina, se recontaron y se
5 añadieron a placas de 96 medio pocillos Costar (Nº de Cat. 3697) a una densidad de 300.000 células por ml. Después de 2 horas las mismas se colocaron en un recipiente sellado en la incubadora durante una noche (25°C, CO₂ al 0%). Al día siguiente el medio se aspiró y a cada pocillo se añadieron 25 µl de MAB (Tampón de Ensayo de Melanóforo) que contenía DMSO al 1% y
10 melatonina 10 nM. Las células se incubaron durante 1 hora y se midió la transmitancia basal en un lector de placa SLT Spectra a 620 nm. A continuación, una serie de dilución (serie de 12 puntos usando intervalos de dilución de 3 veces en MAB) que contenía 25 µl de péptidos y patrones a concentración 2x se añadió directamente a cada pocillo. Los patrones
15 incluyeron melatonina 10 nM, MSH 200 nM y MAB y se usaron para establecer niveles de Respuesta Mínima, Máxima y basal del sistema de ensayo, respectivamente. A continuación de la adición de péptidos y patrones, las placas se incubaron durante 1 hora y la transmitancia se midió como anteriormente. Los datos se analizaron usando Robosage (versión 7.3.2)
20 calculando $(1-Tf/Ti)$ donde Ti es la lectura de línea basal inicial y Tf es la lectura de respuesta.

La activación de receptor 7TM acoplado a G_s (es decir, GLP-1R) conduce a un aumento en AMPc intracelular, provocando que los melanosomas que se han agregado previamente que usan melatonina se
25 vuelvan más dispersos, una respuesta que se mide como una disminución en

la transmitancia de luz a través de la célula. Como alternativa, en las condiciones de disminución de AMPc, los melanosomas se agregan conduciendo a un aumento en la transmitancia de luz a través de la célula. Por lo tanto, a continuación de la transfección y la expresión transitoria de una construcción plasmídica que contiene ADNc de GLP-1R en melanóforos, la potencia relativa de DMS7139 para la activación de GLP-1R se puede calcular a partir de una curva de dosis-respuesta. Los resultados se muestran más adelante en la Tabla 15.

Tabla 15 Potencia de DMS7139 en el ensayo de melanóforo

Nombre del Clon	pCE50 de GLP-1R de cynomolgus	pCE50 de GLP-1R de rata	pCE50 de GLP-1R de ratón	pCE50 de GLP-1R humano
DMS7139	10,62	10,78	9,97	10,63
DMS7139	10,63	11,11	10,50	11,39
DMS7139		10,79		
DMS7139		11,07		
GLP-1 (7-36)	11,03	11,16	11,17	11,43
GLP-1 (7-36)		11,09	11,47	11,40
GLP-1 (7-36)		10,97		

10 Se ensayó el DMS7139 para determinar la potencia en el ensayo usando melanóforos transfectados con GLP-1R humano, de ratón, de rata y de mono cynomolgus en al menos duplicado para cada una de las especies. Las pCE50

157

de los ensayos duplicados se enumeran en la Tabla 15. Las potencias en los receptores de mono cynomolgus, humano y de rata son muy similares con posiblemente potencia ligeramente menor en el receptor de ratón. Globalmente estos datos mostrados en la Tabla 15 proporcionan buena confianza de que la

5 eficacia observada en modelos de ratón con este fármaco probablemente se replicará en especies de toxicología posibles (rata y mono cynomolgus) y también en seres humanos.

Ejemplo 22. Eficacia y duración de acción de DAT0115 y DMS7139 en el modelo de diabetes de tipo II de ratón db/db

10 El objetivo de este estudio era determinar y comparar la duración de acción de DAT0115 y DMS7139 sobre la tolerancia a la glucosa oral en ratones *db/db* de 10-11 semanas de edad (obtenidos de Jackson Labs). Los animales se aleatorizaron a través de grupos de tratamiento mediante niveles de glucosa en sangre ensayados tres días antes del inicio del experimento. Esto aseguró

15 un nivel de glucosa de partida medio similar en cada uno de los grupos de estudio. DAT0115 y DMS7139 se administraron por vía subcutánea a 1 mg/kg a 120 h, 96 h, 72 h o 48 h antes del bolo de glucosa oral (mostrado en la Figura 11A).

El ABC de glucosa se redujo significativamente a lo largo del periodo de

20 tiempo 2 horas en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en comparación con ratones *db/db* tratados con vehículo en todos los puntos de tiempo hasta 120 h para DMS7139 y en todos los puntos de tiempo hasta 96 h para DAT0115 (Figura 11B). Aunque no hubo diferencia estadística entre DAT0115 y DMS7139 dosificados a 72 h, 96 h o 120 h, DAT0115 redujo el ABC

25 de glucosa significativamente más que DMS7139 a 48 h.

Se concluyó que la reducción más consistente de ABC de glucosa mostrada por DMS7139 era representativa de un perfil más deseable de un fármaco en esta clase. Por lo tanto, aunque este estudio no identificó superioridad evidente, DMS7139 se seleccionó como el líder basándose en este y otros datos.

Ejemplo 23. La repetición de dosis de DMS7139 muestra reducción dependiente de la dosis de HbA1c cuando se comparaba con el control de DOM7h-14.

El objetivo de este estudio era examinar la reducción de HbA1c a continuación de la repetición de dosis de DMS7139 en ratones *db/db* de 10-11 semanas de edad (Jackson labs). HbA1c es una forma glicada de hemoglobina cuya concentración se usa como una medición sustituta de la concentración de glucosa en plasma a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Para asegurar el nivel de HbA1c de partida medio similar en cada uno de los grupos de estudio, los ratones *db/db* se aleatorizaron basándose en los niveles de HbA1c tres días antes del inicio del experimento. Los animales se dosificaron con DMS7139 (0,01, 0,03, 0,1, 0,3 mg/kg), Byetta™ (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 mg/kg) o DOM7h-14 (0,3 mg/kg) por vía subcutánea QD durante 2 semanas. Las mediciones de peso corporal, ingesta de alimentos y glucosa se tomaron durante el estudio tomándose las mediciones de HbA1c al final de los 14 días.

La glucosa y HbA1c suministrados se redujeron significativamente en el grupo de tratamiento de DMS7139 a 0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg frente al control (DOM7h-14) aunque los mismos no fueron significativos frente al control con solución salina (véanse los resultados en la Figura 12). Los datos obtenidos a partir del control de solución salina fueron menores que lo esperado basándose

en los datos obtenidos con la dosis más baja de exendina-4 o DMS7139. No hubo cambios observados con exendina-4 en comparación con el control de solución salina. También hubo reducción significativa en el peso corporal y la ingesta de alimentos con DMS7139. La exendina-4 mostró efectos
5 significativos sobre la ingesta de alimentos en la dosis más alta.

Se concluyó que la repetición de dosis con DMS7139 conduce a reducción de HbA1c en ratones *db/db* así como efectos sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal. Estos cambios son coherentes con los que se esperaban de un agonista de GLP-1R.

10 **Ejemplo 24. DAT0115 y DMS7139 mostraron reducción dependiente de la dosis en el consumo de alimentos y el peso corporal en comparación con el control de DOM7h-14 en el modelo de obesidad de ratón obeso inducido por la dieta (DIO).**

El objetivo del estudio descrito en este documento era determinar si el
15 consumo de alimentos y, como resultado, el peso corporal durante un periodo de 10 días está influido por el tratamiento con DAT0115 y DMS7139 y determinar si uno de estos compuestos tenía una duración de acción más larga que el otro. Esto puede ser predictivo para seres humanos. Se condujo un experimento en modelo de alimentación de ratón obeso inducido por la dieta
20 (DIO) con grupos de dosis de DAT0115, Byetta y DMS7139.

Ratones C57B1/6 (Taconic) se engordaron en una dieta irradiada alta en grasas al 60% de kilocalorías (Research Diets D12492) durante 12 semanas y después se transfirieron a la instalación interna. A la llegada, los ratones se alojaron individualmente en camas alpha-dri en una habitación de temperatura
25 y humedad controlada (70-72° F, Humedad = 48-50%, ciclo de luz 5 AM/5 PM).

La dieta se cambió a dieta alta en grasas al 45% (Research Diets D12451) y los animales se aclimataron durante 18 días. Antes de la administración del compuesto, a los ratones se inyectó por vía subcutánea solución salina durante tres días y se supervisó el consumo de alimentos. Los ratones se agruparon de forma que el peso corporal y el consumo de alimentos no fueran diferentes entre grupos. Tres grupos, cada uno dosificado con DAT0115 o DMS7139 a 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg y 1 mg/kg, un grupo con una molécula de control negativo (DOM7h-14 AlbuAb™ a 1 mg/kg) y uno con control positivo de exendina-4 (0,01 mg/kg). El consumo de alimentos y el peso corporal se determinó durante 10 días. DAT0115 y DMS7139 mostraron reducción dependiente de la dosis en el consumo de alimentos y en el peso corporal en comparación con el control de DOM7h-14 (véanse los resultados en la Figura 13). Se observa que la exendina a la que se hace referencia en la Figura 13 era Byetta™. Los datos de este estudio de ratón indican que no existe diferencia estadística entre la eficacia de los mismos.

Ejemplo 25. Análisis de PK de DMS7139 en ratón, rata y mono cynomolgus

Se condujo un conjunto de estudios s.c. e i.v. en tres especies de modelo (ratón *db/db*, rata y mono cynomolgus) con DSM7139. Las dosis se seleccionaron con el objetivo de conseguir concentraciones en plasma que se pronosticaba que eran detectables mediante los ensayos en puntos de tiempo pertinentes: 1 mg/kg i.v. y s.c. en ratón, 1 mg/kg s.c. y 0,3 mg/kg i.v. en rata y 0,1 mg/kg i.v. y s.c. en mono cynomolgus.

Los puntos de tiempo para el muestreo de PK fueron: ratón *db/db* (0,17, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 horas), rata (0,17, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y

120 horas) y mono cynomolgus (0,083 (sólo grupo i.v.), 0,5, 4, 8, 24, 48, 96, 144, 192, 288, 336, 504 y 672 horas (4 semanas)). Se realizó muestreo de sangre en serie, excepto en ratón, donde un animal se sacrificó por punto de dato. Las muestras de plasma se prepararon y se almacenaron congeladas para análisis posterior de los niveles de DMS7139.

Se usaron dos ensayos de cuantificación para analizar muestras de PK en diversos estudios: un procedimiento de ELISA que detecta las partes de exendina-4 y AlbuAb de las moléculas y un procedimiento de HPLC-EM/EM que detecta un péptido N-terminal a partir de exendina-4. Los datos del procedimiento basado en ELISA se muestran en este documento.

ELISA

Los niveles de DAT0115 y DMS7139 en plasma de mono cynomolgus se determinaron usando un ensayo de ELISA. En resumen, placas de 96 pocillos fluoronunc (Nunc N° 437796) se revistieron durante una noche en el refrigerador con anticuerpo anti-exendina-4 (Abcam N° de cat. ab26263) a 5 µg/ml en tampón de carbonato de sodio 50 mM pH 9,4 (100 µl por pocillo). Al día siguiente, las placas se lavaron 5 veces con Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 más tween-20 al 0,1% (300 µl por pocillo) después se bloquearon con 200 µl de tampón de bloqueo (superblock, thermoscientific N° 37535, en TBS) agitando durante aproximadamente 1 hora a 37°C nominalmente. Los pocillos se lavaron como anteriormente y después se incubaron mientras se agitaba con 100 µl de QC, patrones o muestras durante aproximadamente 2 h a 37°C nominalmente. De nuevo, los pocillos se lavaron y después se incubaron con una dilución final 1:2000 de anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana de conejo en tampón de ensayo (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1%, Tween

20 al 0,1% y pH 7,5) con agitación durante 1 h a 37°C nominalmente seguido por lavado como anteriormente. Después los pocillos se incubaron con agitación con 100 µl por pocillo de solución de etiqueta informadora (conjugado anti-IgG de Conejo de Cabra a 1/500.000 en tampón de ensayo a 37°C
5 nominalmente y se lavó como anteriormente. El DAT0115 o GSK2374697A unido se detectó añadiendo 100 µl por pocillo de sustrato de desarrollo (supersignal ELISA femto (thermoscientific N° 37075) con agitación constante durante aproximadamente 1 minuto y después se leyó usando un lector de placa de quimioluminiscencia (Wallac 1420 Victor Mulyilabel Counter (Perkin
10 Elmer Life Sciences).

Los análisis farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales se realizaron en los niveles de plasma medidos usando software WinNonLin versión X TBC (véase la Tabla 16 más adelante). Para los resultados no compartimentales todos los datos de PK para DAT0115 y DMS7139 se
15 recopilaron y ajustaron el mismo día para uniformidad entre los estudios. Los datos mostrados, por lo tanto, son los datos recopilados, los resultados de NCA y las Figuras para DAT0115 y DMS7139.

En mono cynomolgus, se calculó que la semivida era 106,4 h o 112,8 h (iv) y 113,8 h o 113,1 h (sc) calculado mediante procedimientos
20 compartimentales y no compartimentales respectivamente. Se concluyó que en las tres especies, DMS7139 tiene una semivida en plasma que se aproxima a la de la misma albúmina sérica y, por lo tanto, dada la afinidad similar que DMS7139 tiene por albúmina sérica humana (en comparación con albúmina sérica de cynomolgus, por ejemplo) esto proporciona buena confianza de que
25 DMS7139 tendrá una semivida en el hombre que será compatible con la

dosificación semanal (o menos frecuente).

Tabla 16:

A) Datos de ratón *db/db* (datos de ELISA)

			Procedimientos no compartimentales				Procedimientos compartimentales	
Molécula	ROA	Dosis (mg/kg)	ABC 0- inf (h*ng/ml)	CL / CL_F (ml/h/kg)	F (s.c.) (%)	T ½ (h)	CL / CL_F (ml/h/kg)	T ½ (h)
DMS7139	IV	1	815813	1,2	n/a	32,8	1,24	33,7
	SC	1	270107	3,7	33,1	24,9	3,66	26,2

5 B) Datos de rata (datos de ELISA)

			Procedimientos no compartimentales				Procedimientos compartimentales	
Molécula	ROA	Dosis (mg/kg)	ABC 0- inf (h*ng/ml)	CL / CL_F (ml/h/kg)	F (s.c.) (%)	T ½ (h)	CL / CL_F (ml/h/kg)	T ½ (h)
DMS7139	IV	0,1	225925	0,4	n/a	106	0,5	112,8
	SC	0,1	139657	0,7	61,8	114	0,7	113,1

			Procedimientos no compartimentales				Procedimientos compartimentales	
Molécula	ROA	Dosis	ABC 0- inf	CL / CL_F	F (s.c.)	T ½	CL / CL_F	T ½
		(mg/kg)	(h*ng/ml)	(ml/h/kg)	(%)	(h)	(ml/h/kg)	(h)

C) Datos de mono cynomolgus (datos de ELISA)

			Procedimientos no compartimentales				Procedimientos compartimentales	
Molécula	ROA	Dosis	ABC 0- inf	CL / CL_F	F (s.c.)	T ½	CL / CL_F	T ½
		(mg/kg)	(h*ng/ml)	(ml/h/kg)	(%)	(h)	(ml/h/kg)	(h)
DMS7139	IV	0,3	223069	1,3	n/a	25,4	1,4	47,2
	SC	1	151423	7,3	20,4	49,7	7	39,2

Ejemplo 26. Comparación de análisis de PK en DMS7139 y DAT0115 en
5 mono cynomolgus

Para elegir la molécula más deseable para desarrollarla para uso en seres humanos, los parámetros farmacocinéticos en monos cynomolgus se

ms

compararon para DAT0115 y DMS7139 (véase la Tabla 17). Se concluyó que los datos en la tabla mostraron DMS7139 tiene parámetros de PK más deseables que DAT0115, demostrando semivida más larga en mono cynomolgus cuando se administraba por vía subcutánea o por vía intravenosa.

- 5 La semivida más larga tiene el efecto de que en puntos de tiempo posteriores, DMS7139 era consistentemente más elevado en concentración en plasma que DAT0115 (datos no mostrados).

Tabla 17: Comparación de semivida de DAT0115 y DMS7139 en mono cynomolgus

Molécula	ROA (procedimiento de análisis)	Dosis (mg/kg)	Procedimientos no compartimentales				Procedimientos compartimentales	
			ABC 0- inf (h*ng/ ml)	CL / CL_F (ml/h/ kg)	F (s.c.) (%)	T ½ (h)	CL / CL_F (ml/h/ kg)	T ½ Terminal (h)
DAT0115	IV (CL/EM/EM)	0,1	34507,5	3,3	n/a	67,3	4	80,7
	SC (CL/EM/EM)	0,1	34203,8	3,1	99,1	67,9	2,9	91,1
DMS7139	IV (CL/EM/EM)	0,1	238360	0,4	n/a	110	0,4	117,6
	IV (ELISA)	0,1	225925	0,4	n/a	106	0,5	112,8
	SC (CL/EM/EM)	0,1	128093	0,8	53,7	97,7	0,8	82,1

	SC							
	(ELISA)	0,1	139657	0,7	61,8	114	0,7	113,1

Ejemplo 27: Producción del conjugado peptídico de PYY (3-36) DOM7h-14-10 (R108C) AlbudAb™ DMS7605 (que tiene la estructura mostrada en la Figura 14) y que es: un AlbudAb DOM 7h-14-10 (R108C) conjugado al PYY3-36 a través de una lisina y un engarce de PEG de 4 repeticiones): El albudab DOM7h-14-10 (R108C) se expresó y purificó como se ha descrito de la manera siguiente en *E.coli*. El gen que codifica el DOM7h-14-10 (R108C) se clonó en el vector pET30. Para permitir la clonación en el vector de expresión, las fusiones se produjeron como PCR de ensamblaje con el sitio de restricción NdeI en 5' seguido por la secuencia líder PEL B (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 9 (i) SEC ID N°: 46). El vector y las PCR de ensamblaje se digirieron con endonucleasas de restricción NdeI y BamHI seguido por ligamiento del inserto en el vector usando un Kit de Ligamiento Rápido (NEB). 2 microlitros de este ligamiento se usaron para transformación de células MachI. Después del periodo de cultivo de recuperación, las células se sembraron en placas de agar que contenían carbenicilina y se incubaron a 37°C durante una noche. Las colonias se secuenciaron y aquellas que contenían la secuencia correcta se usaron para propagación y aislamiento de plásmido (Plasmid Mini Prep kit, Qiagen). Células BL21(DE3) se transformaron con ADN plasmídico y las colonias resultantes se usaron para inoculación de cultivo de expresión. La expresión se realizó mediante inoculación de un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio terrific broth modificado (Sigma) y esto se inoculó a una DO=0,1 y después se cultivó a 30°C complementado con 50 mg/ml de

117

Karamicina. A $A_{600}=0,5-1$ células se indujeron con IPTG hasta concentración final de $50\text{ }\mu\text{M}$ y el cultivo se continuó a 23°C durante una noche. Después el sobrenadante de cultivo se clarificó mediante centrifugación a 3700 xg durante 1 hora. La proteína expresada después se purificó a partir del sobrenadante clarificado usando Proteína L streamline (GE Healthcare, N° de Cat. 28-4058-03, acoplado a proteína L) y se eluyó de la proteína L usando glicina $0,1\text{ M}$ pH 2,0, después se neutralizó mediante adición de un volumen de elución de $1/5^{\circ}$ de Tris 1 M , pH 8,0. Después se ajustó el pH de la proteína usando Ácido Cítrico $0,1\text{ M}$ a pH 5 y se aplicó a una columna de 30 ml de Source S (GE Healthcare) equilibrada con Citrato de Sodio 50 mM , pH 5. Se aplicó un gradiente de 0-100 de Citrato de Sodio 50 mM , pH 5, NaCl 1 M usando el AktaXpress FPLC (GE healthcare) sobre 150 ml . Se analizaron las fracciones en SDS-PAGE y aquellas que contenían el producto más puro se agruparon. La proteína final se desaló en Fosfato de Sodio 50 mM , pH 6,5, EDTA 5 mM .

Después el AlbudAb Dom7h-14-10 (R108C) se enlazó a una molécula de aminoácido PYY 3-36 (pero con una lisina en la posición 10 que se puede derivatizar con engarce PEG) usando el engarce PEG mostrado en la Figura 14. El PYY y el PEG se prepararon mediante síntesis química convencional. La maleimida en el extremo del engarce PEG después se usó para conjugar el péptido PYY a la cisteína libre del AlbudAb DOM7h-14-10 (R108C) preparado como se ha descrito anteriormente.

El DOM7h-14-10 (R108C) se desaló en Fosfato de Sodio 50 mM , pH 6,5, EDTA 5 mM . El péptido activado con maleimida después se mezcló con la proteína en una proporción de 1:1 y se incubó para permitir que ocurriera la conjugación.

El conjugado se purificó a partir de DOM7h-14-10 (R108C) que no reaccionó mediante cromatografía de Intercambio Iónico de una manera similar a la descrita anteriormente. Las fracciones con alto contenido en conjugado finalmente se purificaron a partir de péptido libre usando purificación por
5 afinidad de Proteína L en una manera similar a la descrita anteriormente. El conjugado de DMS7605 final se sometió a intercambio de tampón y se analizó mediante SDS-PAGE y Espectroscopia de Masas.

**Ejemplo 28: Perfil farmacológico del péptido de fusión de Exendina-4 AlbudAb (DAT0115 preparado como se ha descrito anteriormente) y
10 AlbudAb PYY (3-36) (DMS7605 preparado como se ha descrito en el ejemplo 27 y con la estructura mostrada en la Figura 14) en el bioensayo funcional de melanóforo.**

El perfil farmacológico del AlbudAb Exendina-4 (DAT 0115) y el AlbudAb PYY(3-36) (DMS7605 preparado como se ha descrito en el ejemplo 27 y con la
15 estructura mostrada en la Figura 14 se determinó en un bioensayo funcional de melanóforo usando células transfectadas con receptores de interés. El bioensayo se realizó básicamente como se ha descrito en el ejemplo 21 con las siguientes diferencias: se usaron 80 µg de ADNc para el NPY1R humano, se usaron 40 µg para el NPY1R y 40 µg para los otros receptores de NPY de ratón
20 y humano (NPY2R, NPY4R y NPY5R).

Los perfiles farmacológicos de los péptidos de fusión de AlbudAb Exendina-4 y PYY (3-36) (datos no mostrados) muestran que las fusiones se unen y activan a receptores de NPY tanto de ratón como humanos. DMS7605 se une a NPY1R, NPY2R, NPY4R y NPY5R, siendo NPY2R el activado de
25 forma más marcada (datos no mostrados). Los números de acceso de NPYR

son los siguientes: NPY1R: NM 00909 (humano) y NM 010934 (ratón); NPY2R: NM 00910 (humano) y NM 008731 (ratón); NPY4R: NM 005972 (humano) y NM 008919 (ratón); NPY5R: NM 006174 (humano) y NM 016708 (ratón).

Ejemplo 29: DMS7605 mostró reducción dependiente de la dosis en peso corporal en comparación con control de vehículo en el modelo de obesidad de ratón obeso inducido por la dieta (DIO)

El experimento se condujo en el modelo de obesidad de ratón obeso inducido por la dieta (DIO) para evaluar la eficacia de DMS7605 (también conocido como DMS7167:PYY3-36). El objetivo del estudio aquí descrito era determinar si la ingesta de alimentos y el peso corporal a lo largo de un periodo de 6 días están influidos por el tratamiento con DMS7605. Estos resultados pueden ser predictivos para seres humanos.

Ratones C57Bl/6J macho (Taconic) se engordaron en una dieta alta en grasas al 60% de kcal (Research Diets D12492) durante 12 semanas y después se transfirieron a las instalaciones internas. A su llegada, los ratones se alojaron individualmente en camas alpha-dri en una habitación de temperatura y humedad controlada (70-72° F, Humedad = 48-50%, ciclo de luz 5 AM/5 PM). La dieta se cambió a dieta alta en grasas al 45% (Research Diets D12451) y los animales se aclimataron durante 5 semanas. A los animales se les proporcionó acceso *ad libitum* a alimentos y agua. Antes de la administración de compuesto, los ratones se inyectaron por vía subcutánea con vehículo durante un día y se supervisó el consumo de alimentos. Los ratones se agruparon de forma que el peso corporal y el consumo de alimentos no fueran diferentes entre los grupos. Los grupos se dosificaron un día sí y otro no con vehículo DMS7605 a dosis de 3 mg/kg, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg o 0,1 mg/kg. Se

observaron cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$ mediante ensayo T) en ingesta de alimentos acumulativa en seis días a 3 mg/kg (disminución del 37,3%), 1 mg/kg (disminución del 31,3%) y 0,3 mg/kg (disminución del 21,8%), mientras que no se observaron cambios significativos a 0,1 mg/kg (disminución del 8,7%, $p = 0,07$ mediante ensayo T). El peso corporal se midió los días 0, 3 y 6 después del inicio de la dosificación.

El DMS7605 mostró una reducción dependiente de la dosis en el peso corporal en comparación con el control de vehículo (Figura 15). Se observó una reducción significativa en el peso corporal en todas las dosis ($p < 0,01$ mediante ANOVA de dos vías seguido por análisis Bonferroni post-hoc).

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de fusión o conjugado que comprende o está
constituida por (a) un agente insulínico o un fármaco incretina presente
como una fusión o un conjugado con, (b) un dAb que se une a albúmina sérica
seleccionado entre: (i) el anticuerpo de dominio (dAb) DOM 7h-14 (la secuencia
de aminoácidos de DOM 7h-14 se muestra en la Figura 1 (h): SEC ID N°: 8), (ii)
10 el anticuerpo de dominio (dAb) DOM 7h-14-10 (la secuencia de aminoácidos de
DOM 7h-14-10 se muestra en la Figura 1 (o): SEC ID N°: 26) o un dAb que
tiene hasta 4 diferencias de aminoácidos de la secuencia del dAb DOM 7h-14-
10; y (iii) el dAb DOM 7h-11-15 (la secuencia de aminoácidos de DOM 7h-11-
15 se muestra en la Figura 1 (p): SEC ID N°: 27) o (iv) el anticuerpo de dominio
15 (dAb) DOM 7h-14-10 R108C (la secuencia de aminoácidos de DOM 7h-14-10
se muestra en la Figura 1(r).
2. Una fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el
fármaco es una exendina-4, una molécula de GLP-1 o una molécula de PYY o
20 un mutante o derivado de los mismos que conserva la actividad de unión de la
molécula nativa.
3. Una fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que
el fármaco se selecciona entre (a) el mutante A8G de GLP-1 (7-37) que tiene la
25 secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (i) (SEC ID N°: 9) o (b) la

molécula de exendina-4 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (j) (SEC ID N°: 10) o (c) PYY3-36 o PYY 3-36 que tiene una lisina en la posición 10 y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1s.

5 4. Una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un aminoácido o engarce químico que une el fármaco y el dAb.

5. Una fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el
10 engarce de aminoácido es un engarce helicoidal con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (k) (SEC ID N°: 11) o el engarce gly-ser con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (l) (SEC ID N°: 12).

6. Una fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
15 precedentes, en la que el agente insulínico o el fármaco incretina está presente como parte de una fusión en el extremo N o el extremo C del dAb.

7. Una fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 6 que
comprende o está constituida por una secuencia de aminoácidos seleccionada
20 entre las siguientes:

(a) Fusión de exendina 4, engarce (G4S)₃, DOM7h-14-10 (**DMS7139**)

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLL
IMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGLRHPKFTG
25 QGTKVEIKR

(SEC ID Nº: 24)

(b) Fusión de exendina 4, engarce (G4S)₃, DOM7h-11-15 **(DMS7143)**

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGS

5 GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRPITMLSWYQQKPGKAPKLLI
LAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQG
TKVEIKR

(SEC ID Nº: 25)

10 (c) Un conjugado peptídico que es:

un AlbudAb DOM 7h-14-10 (R108C) conjugado a un PYY3-36 amidado en el extremo C a través de una lisina (introducida en la posición 10 de PYY) y un engarce de PEG de 4 repeticiones como se muestra en la Figura 14.

15 8. Una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dAb se formatea adicionalmente para aumentar su tamaño hidrodinámico uniendo una molécula o moléculas al dAb seleccionadas entre las siguientes: un grupo PEG, albúmina sérica, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción de unión a
20 transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo o mediante conjugación a un dominio de anticuerpo.

9. Una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un resto peptídico o polipeptídico
25 adicional.

10. Una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende restos de dAb adicionales que tienen la misma o diferentes especificidades de unión a los dAb de DOM 7h-14-
5 10 o DOM 7h-11-15.
11. Una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una semivida de eliminación en un ser humano de 12 horas o más, por ejemplo, 12-21 días.
10
12. Una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se une a albúmina sérica humana con KD en el intervalo de aproximadamente 5 micromolar a aproximadamente 1 picomolar.
- 15 13. Una composición farmacéutica que comprende una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.
- 20 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende agentes terapéuticos o activos adicionales.
15. Una composición que comprende (a) una fusión o conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y (b) agentes terapéuticos o activos
25 adicionales, para administración separada, secuencial o concurrente a un

sujeto.

16. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
precedentes para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o
5 trastorno metabólico.

17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la
enfermedad o trastorno se selecciona entre: hiperglucemia, tolerancia a la
glucosa alterada, deficiencia de células beta, diabetes (diabetes de tipo 1 o de
10 tipo 2 o diabetes gestacional), obesidad o enfermedades caracterizadas por
una sobrealimentación.

18. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1-15 en la preparación de un medicamento para tratar o
15 prevenir una enfermedad o trastorno metabólico.

19. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1-15 en la preparación de un medicamento para
administración a un sujeto mediante inyección subcutánea, intravenosa o
20 intramuscular.

20. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1-15 en la preparación de un medicamento para
administración parenteral, oral, rectal, a través de las mucosas, ocular,
25 pulmonar o al tracto GI.

21. Un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad metabólica que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición de acuerdo con una de cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
22. Una formulación oral, inyectable, inhalable o nebulizable que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
23. Una formulación de liberación sostenida, por ejemplo en forma de un supositorio, que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
24. Una formulación liofilizada que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
25. Un dispositivo de administración que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
26. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, por ejemplo, una secuencia seleccionada entre: SEC ID N°: 50, 30, 29, 15-22.
27. Un ácido nucleico que codifica una cualquiera de las fusiones de la reivindicación 7 u 8.

28. Un vector que comprende un ácido nucleico de las reivindicaciones 27 ó 28.
- 5 29. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 27 ó 28 o el vector de la reivindicación 29.
- 10 30. Un procedimiento para producir un polipéptido de fusión que comprende o está constituido por (a) un agente insulínico o un fármaco incretina presente como una fusión con (b) un dAb seleccionado entre anticuerpo de dominio (dAb) DOM 7h-14 -10, DOM 7h-14-10 R108C o DOM 7h-11-15, comprendiendo el procedimiento mantener una célula huésped de la reivindicación 29 en condiciones adecuadas para expresión de dicho ácido nucleico o vector, con lo cual se produce un polipéptido de fusión.
- 15 31. Un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con hiperglucemia en un paciente, por ejemplo, un paciente humano, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición de acuerdo con una cualquiera de 20 cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
- 25 32. Un procedimiento para estimular la producción de insulina y/o aumentar la sensibilidad a insulina en un paciente, por ejemplo, un paciente humano, que comprende administrar a dicho paciente al menos una dosis de una composición de acuerdo con una cualquiera de cualquiera de las

reivindicaciones 1-15.

33. Una secuencia líder modificada que tiene en su extremo C terminal la
secuencia de aminoácidos AMA o AWA, donde la secuencia líder no es la
5 secuencia natural.

34. La secuencia líder modificada de la reivindicación 33, estando la
secuencia seleccionada entre: OmpA-AMA o -AWA; u OmpT-AMA o -AWA; o
GAS-AMA o -AWA.

10

35. Uso de una secuencia líder modificada como se ha definido en la
reivindicación 33 ó 34 para expresión de un polipéptido heterólogo en una
célula huésped.

15 36. Uso de acuerdo con la reivindicación 35, en el que el polipéptido
heterólogo comprende un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo, un dAb
que se une a albúmina sérica.

37. Uso de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36, en el que el polipéptido
20 heterólogo comprende o está constituido por un agente insulínico o un
fármaco incretina.

38. Un procedimiento para producir una mezcla de (i) un agente
insulínico o un fármaco incretina y (ii) un agente insulínico o un
25 fármaco incretina menos dos aminoácidos en el extremo N del agente

insulínótropico o fármaco incretina, comprendiendo el procedimiento la etapa de expresar (i) en una célula huésped usando una secuencia líder que produce como resultado la escisión delante de la posición 1 y la escisión delante de la posición 3 de dicho agente insulínótropico o fármaco incretina.

5

39. Una mezcla de (i) un agente insulínótropico o un fármaco incretina y (ii) un agente insulínótropico o un fármaco incretina menos dos aminoácidos en el extremo N del agente insulínótropico o fármaco incretina obtenido o que se puede obtener mediante procedimiento de la reivindicación 38.

10

Tabla de Secuencias

	SEC ID N°	Nombre del Clon	Longitud	Tipo
5	1	DAT0114	168	Proteína
	2	Dat 0115	163	Proteína
	3	Dat 0116	148	Proteína
10	4	DAT0117	188	Proteína
	5	DAT0118	153	Proteína
15	6	DAT0119	142	Proteína
	7	DAT0120	179	Proteína
	8	DOM7h-14	108	Proteína
20	9	GLP-1 (7-37) A8G	31	Proteína
	10	Exendina-4	39	Proteína
25	11	engarce helicoidal	40	Proteína

	12	engarce Gly-ser	16	Proteína
	13	DAT0114	504	ADN
5	14	DAT0115 de mamífero	489	ADN
	15	DAT0115 de E.coli	495	ADN
10	16	DAT0116 de mamífero	444	ADN
	17	DAT0116 de E.coli	447	ADN
	18	DAT0117 de mamífero	564	ADN
15	19	DAT0117 de E.coli	567	ADN
	20	DAT0118 de mamífero	459	ADN
20	21	DAT0119 de mamífero	426	ADN
	22	DAT0120 de mamífero	537	ADN
25	23	Dom7h-14	324	ADN

	24	Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10	163	Proteína
5	25	Fusión de Exendina 4, Engarce (G4S)3,DOM7h-11-15	163	Proteína
	26	DOM7h-14-10	108	Proteína
	27	DOM7h-11-15	108	Proteína
10	28	OmpT AWA	20	Proteína
	29	Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10	489	ADN
15	30	Exendina 4, engarce(G4S)3, DOM7h-11-115	489	ADN
20	31	Dom7h-14-10	324	ADN
	32	Dom7h-11-15	324	ADN
25	33	OmpAWA	60	ADN

	34	ompA (obtenido de E. coli)	21	Proteína
	35	ompA-AMA	21	Proteína
5	36	ompA-AWA	21	Proteína
	37	ompT (obtenido de E. coli)	20	Proteína
	38	ompT-AMA	20	Proteína
10	39	GAS (obtenido de S. cerevisiae)	22	Proteína
	40	GAS-AMA	22	Proteína
15	41	GAS-AWA	22	Proteína
	42	DOM7h-14-10R108C	108	Proteína
20	43	PYY 3-36 (con una lisina en la posición 10)	34	Proteína
	44	DOM 7h-14-10 R108C	324	ADN
25	45	ADNc de receptor de GLP-1 de Cynomolgus	1389	ADN

5	46	Pel B	22	Proteína
	47	Oligonucleótido 1	115	ADN
	48	Oligonucleótido 2	44	ADN
	49	Mal E	26	Proteína
10	50	DMS 7139 para expresión en E. coli	489	ADN

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Herring, Christopher
Holt, Lucy
Jespers, Laurent
Mayer, Sebastian
Pupecka, Malgorzata

<120> Fusiones y conjugados de fármaco

<130> DB63558 WO

<150> US 61/163917

<151> 2009-03-27

<160> 52

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de 2xGLP-1 A8G DOM7h-14 (DAT0114)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 163

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14
(DAT0115)

<400> 2

```

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

```

<210> 3
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fusión de Exendina 4 DOM7h-14 (DAT0116)

<400> 3

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	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro
			35				40					45			
Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg
			50			55					60				
Ala	Ser	Gln	Trp	Ile	Gly	Ser	Gln	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
65					70					75					80
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Met	Trp	Arg	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser
				85					90					95	
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
				100				105					110		
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				115			120					125			
Ala	Gln	Gly	Ala	Ala	Leu	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val
						135					140				
Glu	Ile	Lys	Arg												
145															

<210> 4
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fusión de Exendina 4, engarce helicoidal, DOM7h-14
 (DAT0117)

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 153

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de GLP-1 A8G, engarce (G4S)3, DOM7h-14
(DAT0118)

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fusión de GLP-1 A8G, engarce PSS, DOM7h-14 (DAT0119)

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fusión de GLP-1 A8G, engarce helicoidal, DOM7h-14
 (DAT0120)

<400> 7

```

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

```

```

          115          120          125
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
      130          135          140
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 145          150          155          160
Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
      165          170          175
Ile Lys Arg

```

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DOM7h-14

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 9

```

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

```

<210> 10
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> exendina-4

<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> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> engarce helicoidal

<400> 11

```

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1           5           10           15
Glu Leu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu
          20           25           30
Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala
          35           40

```

<210> 12
 <211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Engarce Gly-ser

<400> 12
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 504
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> DAT0114 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 13
catggtgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggcca catggtgaag ggacctttac cagtgatgta 120
agttcttatt tggaaggcca agctgccaag gaattcattg cttggctggt gaaaggcca 180
gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 240
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 300
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 360
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 420
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 480
gggaccaagg tggaatcaa acgg 504

<210> 14
<211> 489
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> DAT0115 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 14
catggtgaag gaacattttac cagtgacttg tcaaaacaga tggaagagga ggcagtgcgg 60
ttattttattg agtggcttaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcgggt 120
ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggcagc ggcggtggcg ggtcggacat ccagatgacc 180
cagtctccat cctccctgtc tgcactctgta ggagaccgtg tcaccatcac ttgccgggca 240
agtcagtgga ttgggtctca gttatcttgg taccagcaga aaccagggaag agcccctaag 300
ctcctgatca tgtggcggtc ctcggttgcaa agtggggtcc catcacgttt cagtggcagt 360
ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagctctgc aacctgaaga ttttgctacg 420
tactactgtg ctcagggtgc ggcgttgccct aggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa 480
atcaaacgg 489

<210> 15
<211> 495
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0115 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de *E. coli*)

<400> 15

```

cacggtgaag gtaccttcac ctctgacctg agcaaacaga tggaggaaga agcgggttcgt 60
ctgttcatcg agtggctgaa aaacgggtgg cctctctctg gtgctccgcc accgtctggt 120
ggtgggtggg gttctgggtg tgggtggtct ggtggtggcg gtagcgacat ccagatgact 180
cagtcccaaa gctctctgtc tgcctccgtt ggcgatcgtg ttacgatcac gtgccgtgct 240
tctcagtggg tcggttccca gctgtcctgg tatcagcaga aaccgggcaa agccccgaaa 300
ctcctgatca tgtggcgtag ctctctgcag tctggtgtac cgagccgctt ctctggttct 360
ggttctggta ccgacttcac cctgaccatt tctctctgc agccggaaga ttctcgcgacc 420
tactactgtg ctcagggtgc ggcactgcc cgtacttttg gccagggtac gaaagtcgag 480
attaaacggtt aatga 495

```

<210> 16

<211> 444

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0116 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 16

```

catggtgaag gaacatttac cagtgacttg tcaaaacaga tggagagga ggcagtgcgg 60
ttattttattg agtggcttaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcggg 120
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 180
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 240
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 300
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 360
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 420
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 444

```

<210> 17

<211> 447

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0116 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción *E. coli*)

<400> 17

```

cacggtgaag gtaccttcac ctctgacctg agcaaacaga tggaggaaga agcgggttcgt 60
ctgttcatcg agtggttgaa aaacggtggt ccgtcttctg gtgctccgcc accgtctgac 120
atccagatga ctcagtcgcc aagctctctg tctgcctccg ttggcgatcg tgttacgac 180
acgtgccgtg cttctcagtg gatcggttcc cagctgtcct ggtatcagca gaaaccgggc 240
aaagccccga aactcctgat catgtggcgt agctctctgc agtctggtgt accgagccgc 300
ttctctggtt ctggttcttg taccgacttc accctgacca ttctctctct gcagccggaa 360
gatttcgcga cctactactg tgctcagggt gcggcactgc cacgtacttt tggccagggt 420
acgaaagtcg agattaaacg ttaatga 447

```

<210> 18

<211> 564

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0117 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 18

```

catggtgaag gaacatttac cagtgacttg tcaaaacaga tggaggaaga ggcagtgcgg 60
ttatttatag agtggtctaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcgggt 120
aaagaagcgg cggcgaaaga agcggcgggc aaagaagcgg cggcgaaaga attggccgca 180
aaagaagcgg cggcgaaaga agcggcgggc aaagaagcgg cggcgaaaga attggccgca 240
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 300
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 360
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgctcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 420
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 480
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 540
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 564

```

<210> 19

<211> 567

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0117 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción d *E. coli*)

<400> 19

```

cacggtgaag gtaccttcac ctctgacctg agcaaacaga tggaggaaga agcgggttcgt 60
ctgttcatcg agtggttgaa aaacggtggt ccgtcttctg gtgctccgcc accgtctaaa 120
gaagcggcgg cgaaagaagc ggcggcgaaa gaagcggcgg cgaaagaatt ggccgcaaaa 180
gaagcggcgg cgaaagaagc ggcggcgaaa gaagcggcgg cgaaagaatt ggccgcagac 240
atccagatga ctcagtcgcc aagctctctg tctgcctccg ttggcgatcg tgttacgac 300
acgtgccgtg cttctcagtg gatcggttcc cagctgtcct ggtatcagca gaaaccgggc 360
aaagccccga aactcctgat catgtggcgt agctctctgc agtctggtgt accgagccgc 420
ttctctggtt ctggttcttg taccgacttc accctgacca ttctctctct gcagccggaa 480
gatttcgcga cctactactg tgctcagggt gcggcactgc cacgtacttt tggccagggt 540
acgaaagtcg agattaaacg ttaatga 567

```

<210> 20

<211> 459

<212> ADN

<213> DAT0118 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<220>

<223> DAT0118 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 20

```
catggtgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggccga ggtggaggcg gttcaggcg aggtggcagc 120
ggcgggtggcg ggtcggacat ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta 180
ggagaccgtg tcaccatcac ttgccgggca agtcagtgga ttgggtctca gttatcttgg 240
taccagcaga aaccaggga agcccctaag ctctgatca tgtggcggtc ctggttgcaa 300
agtgggggtcc catcacgttt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc 360
agcagtctgc aacctgaaga ttttgctacg tactactgtg ctgagggtgc ggcgttgcc 420
aggacgttcg gccaaaggac caagtgga atcaaacgg 459
```

<210> 21

<211> 426

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0119 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 21

```
catggtgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggccga ggaccaagct cggacatcca gatgaccag 120
tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gaccgtgtca ccatcacttg ccgggcaagt 180
cagtggattg ggtctcagtt atcttggtac cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc 240
ctgatcatgt ggcgttcctc gttgcaaagt ggggtcccat cacgtttcag tggcagtgga 300
tctgggacag atttcactct caccatcagc agtctgcaac ctgaagattt tgctacgtac 360
tactgtgctc aggggtgcggc gttgcctagg acgttcggcc aagggaacaa ggtggaaatc 420
aaacgg 426
```

<210> 22

<211> 537

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DAT0120 - secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero)

<400> 22

```
catggtgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggccga ggaaaagaag cggcggcgaa agaagcggcg 120
gcgaaagaag cggcggcgaa agaattggcc gcaaaagaag cggcggcgaa agaagcggcg 180
gcgaaagaag cggcggcgaa agaattggcc gcagacatcc agatgaccca gtctccatcc 240
tccctgtctg catctgtagg agaccgtgtc accatcactt gccgggcaag tcagtggatt 300
gggtctcagt tatcttggtg ccagcagaaa ccagggaag cccctaagct cctgatcatg 360
tggtgttcct cgttgcaaag tgggtccca tcacgtttca gtggcagtgg atctgggaca 420
gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa cctgaagatt ttgctacgta ctactgtgct 480
cagggtgcgg cgttgccatg gacgttcggc caagggaac aggtggaaat caaacgg 537
```

<210> 23
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dom7h-14 - secuencia de ácido nucleico

<400> 23
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 24
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10
 (DMS7139)

<400> 24
 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 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 50 55 60
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 85 90 95
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly
 100 105 110
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 115 120 125
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 130 135 140
 Gln Gly Leu Arg His Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 145 150 155 160
 Ile Lys Arg

<210> 25
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-11-15
(DMS7143)

<400> 25

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

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DOM7h-14-10

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> DOM7h-11-15 Secuencia Artificial

<220>
 <223> DOM7h-11-15

<400> 27
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Met
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Leu Ala Phe Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

<210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido señal (líder) OmpT AWA

<400> 28
 Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Ala Trp Ala
 20

<210> 29
 <211> 489
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10
 (DMS7139)

<400> 29

```

catggtgaag gaacattttac cagtgaacttg tcaaaacaga tggaagagga ggcagtgcgg 60
ttattttattg agtggccttaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcgggt 120
ggtggaggcg gttcaggcg aggtggcagc ggcggtggcg ggtcggacat ccagatgacc 180
cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta ggagaccgtg tcaccatcac ttgccgggca 240
agtcagtgga ttgggtctca gttatcttgg taccagcaga aaccaggga agcccctaag 300
ctcctgatca tgtggcggtc ctggttgcaa agtggggtcc catcacgttt cagtggcagt 360
ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagtctgc aacctgaaga ttttgctacg 420
tactactgtg ctgagggtt gaggcatacct aagacgttcg gccaggggac caaggtggaa 480
atcaaacgg                                     489

```

<210> 30

<211> 489

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-11-115
(DMS7143)

<400> 30

```

catggtgaag gaacattttac cagtgaacttg tcaaaacaga tggaagagga ggcagtgcgg 60
ttattttattg agtggccttaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcgggt 120
ggtggaggcg gttcaggcg aggtggcagc ggcggtggcg ggtcggacat ccagatgacc 180
cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta ggagaccgtg tcaccatcac ttgccgggca 240
agtcgtccga ttgggacgat gttaagtgg taccagcaga aaccaggga agcccctaag 300
ctcctgatcc ttgctttttc ccgtttgcaa agtggggtcc catcacgttt cagtggcagt 360
ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagtctgc aacctgaaga ttttgctacg 420
tactactgcg cgcaggctgg gacgatacct acgacgttcg gccaggggac caaggtggaa 480
atcaaacgg                                     489

```

<210> 31

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dom7h-14-10 - ácido nucleico

<400> 31

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag gggttgaggc atcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg                                     324

```

<210> 32

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dom7h-11-15 - ácido nucleico

<400> 32

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtcg tccgattggg acgatgttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatccttgct ttttcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgcgcgcag gctgggacgc atcctacgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa acgg                                     324
```

<210> 33

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido señal OmpAWA - secuencia de ácido nucleico

<400> 33

```
atgcggggcga aactcctagg aatagtcctg acaacccta tcgcgatcag cgcttggggc 60
```

<210> 34

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ompA (obtenido de *E. coli*)

<400> 34

```
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1           5           10           15
Thr Val Ala Gln Ala
                20
```

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ompA-AMA (Secuencia Artificial)

<400> 35

```
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1           5           10           15
Thr Val Ala Met Ala
                20
```

<210> 36
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ompA-AWA

<400> 36
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Trp Ala
 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ompT (obtenido de *E. coli*)

<400> 37
 Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Ser Phe Ala
 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ompT-AMA

<400> 38
 Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Ala Met Ala
 20

<210> 39
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> GAS (obtenido de *S. cerevisiae*)

<400> 39

Met	Leu	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Phe
1				5					10					15	
Ala	Gly	Val	Ala	Thr	Ala										
				20											

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> GAS-AMA

<400> 40

Met	Leu	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Phe
1				5					10					15	
Ala	Gly	Val	Ala	Met	Ala										
				20											

<210> 41

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> GAS-AWA

<400> 41

Met	Leu	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Phe
1				5					10					15	
Ala	Gly	Val	Ala	Trp	Ala										
				20											

<210> 42

<220>

<223> DOM7h-14-10R108C

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PYY 3-36 (con una lisina en la posición 10)

<400> 43

```

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

```

<210> 44

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DOM 7h-14-10 R108C - secuencia de ácido nucleico

<400> 44

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgttttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtttgaggc atcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa atgt                                     324

```

<210> 45

<211> 1389

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de receptor de GLP-1 de Cynomolgus

<400> 45

```

atggccggca cccccggccc gctgcgcctc ggcctcctgc tgctcggggt ggtgggcagg 60
gccggccccc gccccagggg tgccactgtg tccctctggg agacggtgca gaaatggcga 120
gaataaccgac gccagtgccca ggcctccctg actgaggacc cacctcccgc cacagacttg 180
ttctgcaacc ggaccttcga tgaatatgcc tgctggccag atggggagcc aggctccttc 240
gtgaatgtca gctgcccctg gtacctgccc tgggccagca gtgtgccgca gggccacgtg 300
taccggttct gcacagctga aggcctctgg ctgcagaagg acaactccag cctgccctgg 360
agggacttgt cggagtgtga ggagtccaag cgaggggaga gaaattcccc ggaggagcag 420
ctcctgtccc tctacatcat ctacacggtg ggctacgcac tctccttctc tgctctggtt 480
atgcctctg cgatcctcct tggcttcaga cacctgcaact gcacccggaa ctacatccac 540
ctgaacctgt ttgcatcctt catcctgcga gcattgtccg tcttcatcaa ggacgcagcc 600
ctcaagtgga tgtacagcac ggccgcccag cagcaccagt gggatgggct cctctcctac 660
caggactctc tgggctgccg cgtggtgttt ctgctcatgc aatactgtgt gccggccaat 720
tactactggc tcttgggtgga gggcgtgtac ctgtacacac tgctggcctt ctcggtcttc 780
tctgagcaac gaatcttcag gctgtatgtg agcgtaggct ggggtgttcc cctgctgttt 840
gttgctccct ggggcattgt caagtacctc tatgaggacg agggctgctg gaccaggaac 900
tccaacatga actactggct cattatccgg ctgcccattc tctttgccat tggggtgaac 960
ttcctcatct ttgttcgggt catctgcac gtggtatcca aactgaaggc caatctcatg 1020
tgcaagacag acatcaaatt cagacttgcc aagtccacgc tgacactcat cccctgctg 1080
gggactcatg aggtcatctt tgcctttgtg atggacgagc atgcccgggg caccctgcgc 1140

ttcatcaagc tgttcacgga gctctccttt acctccttcc aggggctgat ggtggccatc 1200
ttgtactgct ttgtcaacaa tgaggctccag ttggaatttc ggaagagctg ggagcgctgg 1260
cggtttgagc acttgacat ccagagggac agcagcatga agcccctcaa gtgtcccacc 1320
agcagcctga gcagtggggc cacggcgggc agcagcatgt acacagccac ttgccaggcc 1380
tctgcagc                                     1389

```

<210> 46

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PeI B

<400> 46

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1             5             10             15
Ala Gln Pro Ala Met Ala
                20

```

<210> 47

<211> 115

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido 1

<400> 47
ggaattccat atgaaaatca aaaccggtgc tcgcatcctg gctctgtccg ctctgaccac 60
tatgatgttc tccgcttccg cgctggctca tggatgaagga acatttacca gtgac 115

<210> 48
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido 2

<400> 48
gttcagaatt cttattaccg ttgatttcc accttggtcc ctg 44

<210> 49
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia señal Mal E

<400> 49
Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15
Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala
20 25

<210> 50
<211> 489
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de DMS 7139 para expresión en *E. coli*

<400> 50

```
cacggtgaag gtacgttcac ctctgacctg agcaaacaga tggaggaaga agcggttcgt 60
ctgttcacg agtggctgaa aaacgggtgg cctgtttctg gtgctcggcc gccgtctggt 120
ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggtggtggtg gcagcgatat ccagatgact 180
cagtccccgt cttctctctc cgcctctgtt ggcgaccgtg ttaccatcac ttgtcgtgcg 240
agccagtgga tcggttccca gctgagctgg tatcagcaga aaccgggcaa agcgccgaaa 300
ctgctgatca tgtggcgctc tagcctgcag tctggtgtac cgtctcgttt ctccggctct 360
ggttctggtg cggacttcac cctcacgac tcttcctgc agccggaaga ctttgccacc 420
tactactgcg cacagggctt gcgtcaccgg aaaaccttcg gtcaggggtac caaagtcgag 480
atcaaacgt 489
```

FIGURAS:

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de:

(a) Fusión de 2xGLP-1 A8G DOM7h-14 (**DAT0114**)

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRHGEGTFTSDVSSYLEGQAAKE
FIAWLVKGRDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQWIGSQLSWYQQKPGK
APKLLIPMRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGAALP
RTFGQGTKVEIKR

(SEC ID N° 1)

(b) Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14 (**DAT0115**)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLI
PMRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQG
TKVEIKR

(SEC ID N° 2)

(c) Fusión de Exendina 4 DOM7h-14 (**DAT0116**)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVITITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIPMRSSLQSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

(SEC ID N° 3)

(d) Fusión de Exendina 4, engarce helicoidal, DOM7h-14 (**DAT0117**)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGKEAAAKEAAAK
EAAAKELAAKEAAAKEAAAKEAAAKELAADIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT
CRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIPMRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

(SEC ID N° 4)

Figura 1 continuación:

(e) Fusión de GLP-1 A8G, engarce (G4S)₃, DOM7h-14 (**DAT0118**)

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIPMRSSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR
(SEC ID N° 5)

(f) Fusión de GLP-1 A8G, engarce PSS, DOM7h-14 (**DAT0119**)

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIPMRSSLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR
(SEC ID N° 6)

(g) Fusión de GLP-1 A8G, engarce helicoidal, DOM7h-14 (**DAT0120**)

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGKEAAAKEAAAKEAAKELA
AKEAAAKEAAAKEAAKELAADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIG
SQLSWYQQKPGKAPKLLIPMRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF
ATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR
(SEC ID N° 7)

(h) DOM7h-14:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIPMR
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVE
IKR
(SEC ID N° 8)

(i) GLP-1 (7-37) A8G:

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
(SEC ID N° 9)

(j) Exendina-4:

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

(SEC ID N° 10)

Figura 1 continuación:

(k) engarce helicoidal:

KEAAAKEAAAKEAAAKELAAKEAAAKEAAAKEAAAKELAA

(SEC ID N° 11)

(l) engarce Gly-ser:

GGGGGSGGGGSGGGGS

(SEC ID N° 12)

(m) Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10 (DMS7139)

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLI
PMRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQG
TKVEIKR

(SEC ID N° 24)

(n) Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-11-15 (DMS7143)

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLI
LAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQG
TKVEIKR

(SEC ID N° 25)

(o) DOM7h-14-10

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIPMRS
SLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVE
IKR

(SEC ID N° 26)

(p) DOM7h-11-15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLILAFSR
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEI
KR

(SEC ID N° 27)

(q) Péptido señal OmpT AWA (líder)

MRAKLLGIVLTTPIAISAWA

(SEC ID N° 28)

(r) DOM7h-14-10R108C

dqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqwigsqswyqqkpgkapklliPmrsslqsgvps
rfsgsgsgtdftltisslqpedfatyycaqglrhpkftfgggtkveikc

(SEC ID N° 42)

(s) PYY 3-36 (con una lisina en la posición 10)

IKPEAPGKDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

(SEC ID N° 43)

Figura 2: Secuencias de ácido nucleico

(a) DAT0114 – Secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):

CATGGTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCA
 AGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGACATGGTGAA
 GGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAA
 GGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGACATCCAGATGACCCAG
 TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTTG
 CCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAA
 CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAA
 GTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT
 CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGC
 TCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA
 ATCAAACGG

(SEC ID N° 13)

(b) DAT0115 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGG
 AGGCAGTGCGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAG
 CGGGGCACCTCCGCCATCGGGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGC
 AGCGGCGGTGGCGGGTCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC
 TGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG
 TGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC
 CTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG
 TCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCGT
 TGCCTAGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 14)

(c) DAT0115 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de *E.coli*):
CACGGTGAAGGTACCTTCACCTCTGACCTGAGCAAACAGATGGAGGAAG
AAGCGGTTTCGTCTGTTCATCGAGTGGCTGAAAAACGGTGGTCCGTCTTCT
GGTGCTCCGCCACCGTCTGGTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTC
TGGTGGTGGCGGTAGCGACATCCAGATGACTCAGTCCCCAAGCTCTCTGT
CTGCCTCCGTTGGCGATCGTGTTACGATCACGTGCCGTGCTTCTCAGTGG
ATCGGTTCCAGCTGTCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCCCCGA
AACTCCTGATCATGTGGCGTAGCTCTCTGCAGTCTGGTGTACCGAGCCGC
TTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCTGACCATTTCTCTCTG
CAGCCGGAAGATTTGCGGACCTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCACTGC
CACGTACTTTTGGCCAGGGTACGAAAGTCGAGATTAAACGTTAATGA
(SEC ID N° 15)

(d) DAT0116 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):

CATGGTGAAGGAACATTTACCAAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGG
AGGCAGTGC GGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAG
CGGGGCACCTCCGCCATCGGGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGT
CAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAG
CCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGG
CGTTGCCTAGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 16)

Figura 2 continuación:

(e) DAT0116 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de *E.coli*):
CACGGTGAAGGTACCTTCACCTCTGACCTGAGCAAACAGATGGAGGAAG
AAGCGGTTTCGTCTGTTTCATCGAGTGGCTGAAAAACGGTGGTCCGTCTTCT
GGTGCTCCGCCACCGTCTGACATCCAGATGACTCAGTCCCCAAGCTCTCT
GTCTGCCTCCGTTGGCGATCGTGTTACGATCACGTGCCGTGCTTCTCAGT
GGATCGGTTCCCAGCTGTCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCCCC
GAAACTCCTGATCATGTGGCGTAGCTCTCTGCAGTCTGGTGTACCGAGCC
GCTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGACCATTTCCTCTC
TGCAGCCGGAAGA
TTTCGCGACCTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCACTGCCACGTACTTTTG
GCCAGGGTACGAAAGTCGAGATTAAACGTTAATGA
(SEC ID N° 17)

(f) DAT0117 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):
CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAACAGATGGAAGAGG
AGGCAGTGCGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAG
CGGGGCACCTCCGCCATCGGGTAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGC
GGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAATTGGCCGCAAAGAAGCGGCGGC
GAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAATTGGCCGCGA
CATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACC
GTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGC
GTTCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC
TACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
(SEC ID N° 18)

Figura 2 continuación:

(g) DAT0117 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de *E.coli*):

CACGGTGAAGGTACCTTCACCTCTGACCTGAGCAAACAGATGGAGGAAG
AAGCGGTTCGTCTGTTTCATCGAGTGGCTGAAAAACGGTGGTCCGTCTTCT
GGTGCTCCGCCACCGTCTAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCG
AAAGAAGCGGCGGCGAAAGAATTGGCCGCAAAAGAAGCGGCGGCGAAA
GAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAATTGGCCGCAGACATC
CAGATGACTCAGTCCCCAAGCTCTCTGTCTGCCTCCGTTGGCGATCGTGT
TACGATCACGTGCCGTGCTTCTCAGTGGATCGGTTCCCAGCTGTCCTGGT
ATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCCCCGAAACTCCTGATCATGTGGCGTAG
CTCTCTGCAGTCTGGTGTACCGAGCCGCTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTAC
CGACTTCACCCTGACCATTTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCT
ACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCACTGCCACGTACTTTTGGCCAGGGTACG
AAAGTCGAGATTAAACGTTAATGA

(SEC ID N° 19)

(h) DAT0118 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):

CATGGTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCA
AGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGTGGAGGC
GGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGGACATCCAGATG
ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCCTCGTT
GCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
TTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTA
CTGTGCTCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG
GTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 20)

Figura 2 continuación:

(i) DAT0119 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):

CATGGTGAAGGGACCTTTACCAAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCA
AGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGACCAAGC
TCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGG
AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAG
TTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCA
TGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG
ATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTTT
GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 21)

(j) DAT0120 – secuencia de ácido nucleico (a partir de construcción de mamífero):

CATGGTGAAGGGACCTTTACCAAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCA
AGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAAAAGAA
GCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAATTG
GCCGAAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGC
GGCGAAAGAATTGGCCGACAGATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC
CTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATC
ACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA
GTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCG
TTGCCTAGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 22)

Figura 2 continuación:

(k) Dom7h-14 – secuencia de ácido nucleico

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTG
GCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT
GCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTTTCGGCCA
AGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 23)

(l) Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-14-10 (DMS7139)

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGG
AGGCAGTGCGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAG
CGGGGCACCTCCGCCATCGGGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGC
AGCGGCGGTGGCGGGTTCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC
TGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG
TGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC
CTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG
TCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGC
ATCCTAAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

(SEC ID N° 29)

(m) Fusión de Exendina 4, engarce (G4S)3, DOM7h-11-115 (DMS7143)

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGG
AGGCAGTGCGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAG
CGGGGCACCTCCGCCATCGGGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGC

AGCGGCGGTGGCGGGTCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC
 TGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGT
 CCGATTGGGACGATGTAAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC
 CTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAACATCAGCAG
 TCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTGGGACGC
 ATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
 (SEC ID N° 30)

(n) Dom7h-14-10 – ácido nucleico

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
 CCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
 CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTG
 GCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAT
 CTGGGACAGATTTCACTCTCAACATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT
 GCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTTCGGCCA
 A GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
 (SEC ID N° 31)

(o) Dom7h-11-15 – ácido nucleico

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
 CCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTAA
 GTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTGC
 TTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAT
 CTGGGACAGATTTCACTCTCAACATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT
 GCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCC
 AA GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
 (SEC ID N° 32)

(p) Péptido señal OmpAWA – secuencia de ácido nucleico

atcgggcgaaactcctaggaatagtctgacaaccctatcgcatcagcgcttgggcc

(SEC ID N° 33)

(q) DOM 7h-14-10 R108C – secuencia de ácido nucleico

gacatccagatgacccagttccatcctccctgtctgcatctgtaggagaccgtgtcaccatcacttgccgggcaagtcag
 tggattgggtctcagttatcttggtaccagcagaaaccagggaagccctaagctcctgatcatgtggcggtcctcgttgc
 aaagtggggtcccatcacgttcagtggcagtggtctgggacagatttcaactctcaccatcagcagctgtgcaacctgaag
 atttgctactactgtgctcagggttgaggcatcctaagacgttcggccaagggaagtggaatcaaatgt

(SEC ID N° 44)**(r) Secuencia de ADNc de receptor de GLP-1 de Cynomolgus**

ATGGCCGGCACCCCCGGCCCGCTGCGCCTCGCGCTCCTGCTGCTCGGGGT
 GGTGGGCAGGGCCGGCCCCCGCCCCAGGGTGCCACTGTGTCCCTCTGG
 GAGACGGTGCAGAAATGGCGAGAATACCGACGCCAGTGCCAGCGCTCCC
 TGA CTGAGGACCCACCTCCCGCCACAGACTTGTTCTGCAACCGGACCTTC
 GATGAATATGCCTGCTGGCCAGATGGGGAGCCAGGCTCCTTCGTGAATG
 TCAGCTGCCCCCTGGTACCTGCCCTGGGCCAGCAGTGTGCCGCAGGGCCA
 CGTGTACCGGTTCTGCACAGCTGAAGGCCTCTGGCTGCAGAAGGACAAC
 TCCAGCCTGCCCTGGAGGGACTTGTCGGAGTGTGAGGAGTCCAAGCGAG
 GGGAGAGAAATTCCCCGGAGGAGCAGCTCCTGTCCCTCTACATCATCTA
 CACGGTGGGCTACGCACTCTCCTTCTCTGCTCTGGTTATCGCCTCTGCGA
 TCCTCCTTGCTTCAGACACCTGCACTGCACCCGGA ACTACATCCACCTG
 AACCTGTTTGATCCTTCATCCTGCGAGCATTGTCCGTCTTCATCAAGGA
 CGCAGCCCTCAAGTGGATGTACAGCACGGCCGCCAGCAGCACCAGTGG
 GATGGGCTCCTCTCCTACCAGGACTCTCTGGGCTGCCGCGTGGTGTCTTCT
 GCTCATGCAATACTGTGTGGCGGCCAATTACTACTGGCTCTTGGTGGAGG
 GCGTGTACCTGTACACACTGCTGGCCTTCTCGGTCTTCTCTGAGCAACGA
 ATCTTCAGGCTGTATGTGAGCGTAGGCTGGGGTGTTCCCCTGCTGTTTGT
 TGTCCCCTGGGGCATTGTCAAGTACCTCTATGAGGACGAGGGCTGCTGG
 ACCAGGAACTCCAACATGAACTACTGGCTCATTATCCGGCTGCCCATCTCT
 CTTTGCCATTGGGGTGAACCTCCTCATCTTTGTTTCGGGTCATCTGCATCGT
 GGTATCCA AACTGAAGGCCAATCTCATG TGCAAGACAGACATCAAATG

CAGACTTGCCAAGTCCACGCTGACACTCATCCCCCTGCTGGGGACTCATG
 AGGTCATCTTTGCCTTTGTGATGGACGAGCATGCCCGGGGCACCCTGCGC
 TTCATCAAGCTGTTCACGGAGCTCTCCTTTACCTCCTTCCAGGGGCTGAT
 GGTGGCCATC TTGTACTGCTTTGTCAACAATGAGGTCCAGTTGGAATTTTC
 GGAAGAGCTGGGAGCGCTGGCGGCTTGAGCACTTGACATCCAGAGGGA
 CAGCAGCATGAAGCCCCTCAAGTGTCCCACCAGCAGCCTGAGCAGTGGG
 GCCACGGCGGGCAGCAGCATGTACACAGCCACTTGCCAGGCCTCCTGCA
 GC

(SEC ID N° 45)

(s) Oligonucleótido 1

GGAATTCCATATGAAAATCAAACCGGTGCTCGCATCCTGGCTCTGTCCG
 CTCTGACCACTATGATGTTCTCCGCTTCCGCGCTGGCTCATGGTGAAGGA
 ACATTTACCAGTGAC

(SEC ID N° 47)

(t) Oligonucleótido 2

G TTCAGAA TTCTTATTACCGTTTGATTTCACCTTGGTCCCTTG

(SEC ID N° 48)

(u) secuencia de ácido nucleico de DMS 7139 para expresión en E.coli

cacgggtaagggtacgttcaccttgacctgagcaaacagatggaggaagaagcgggtcgtctgttcacgagtggtga
 aaaacgggtggtccgtctctggtgctccgcccgctctggtggtggtggtggtctggtggtggtggtctggtggtggtg
 gcagcgatatccagatgactcagtcacctctctctccgcctctgttggcgaccgtgtaccatcacttgctgtcgag
 ccagtggtatcggtccagctgagctggtatcagcagaaccgggcaaagcgccgaaactgctgatcatgtggcgctct
 agcctgcagctctggtgtaccgtctcgttctccggctctggtctggtacggacttcacctcagatctctccctgcagcc
 ggaagactttgccactactactgcgcacagggtctgcgtcaccgaaaaccttcggtcagggtaccaaagtcgagatc
 aaacgt

(SEC ID N° 50)

Figura 3a: Muestra reducción dependiente de la dosis en peso corporal en modelo de obesidad de ratón administrando DAT0115.

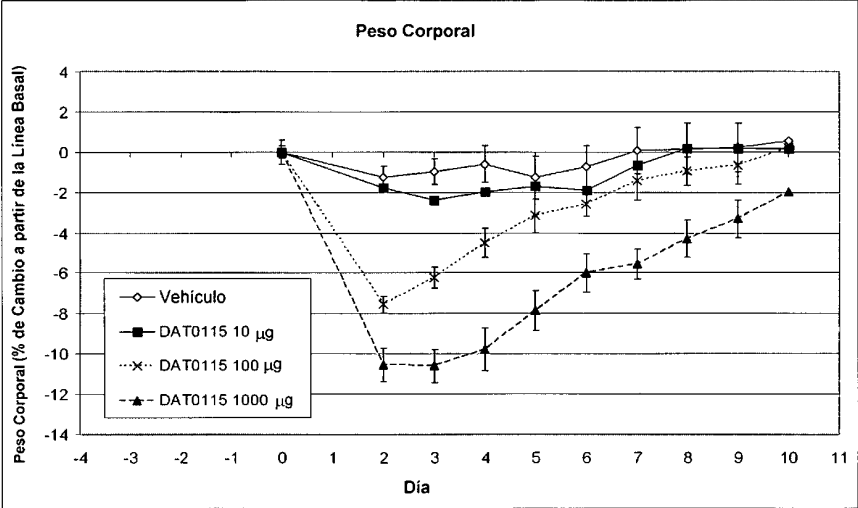


Figura 3b. Muestra consumo de alimentos diario en modelo de obesidad de ratón mediante la administración de DAT0115

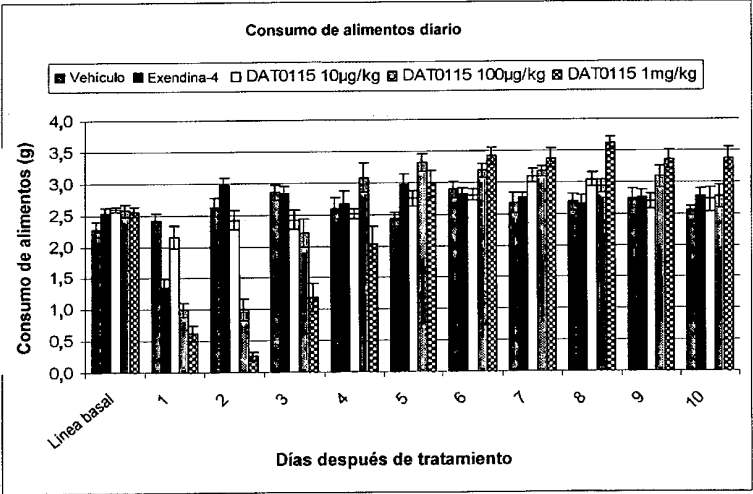


Figura 4: DSC de DAT0115: Línea continua – traza de DAT0115, línea de puntos – ajuste a un modelo que no es de 2 estados.

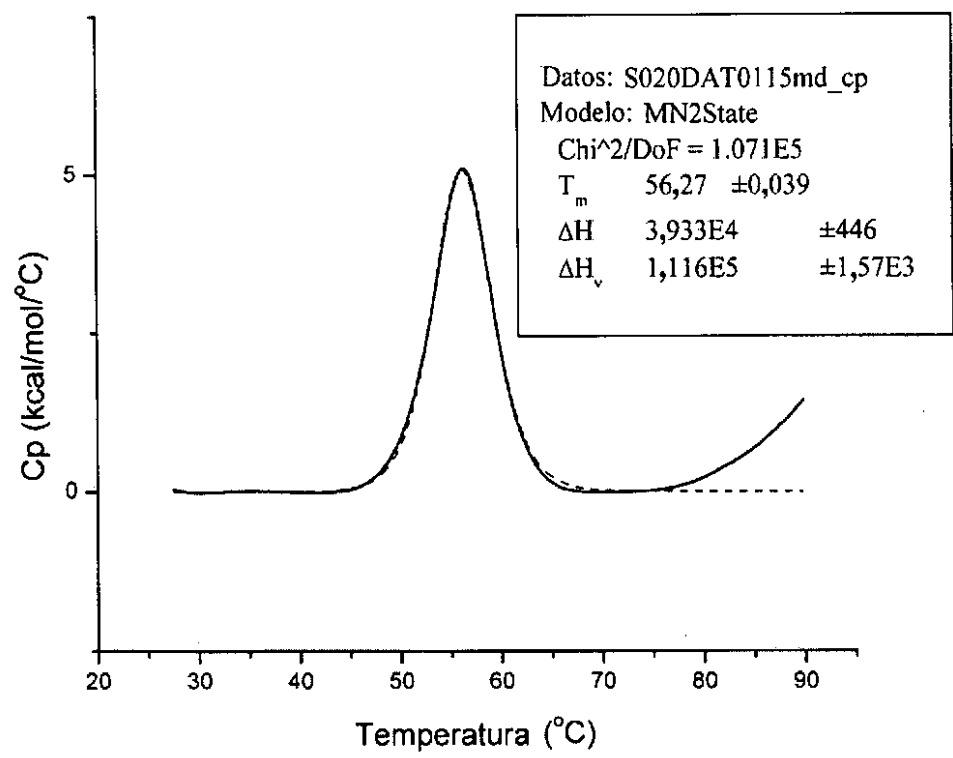


Figura 5: DSC de Lisozima: Línea continua – traza de lisozima, Línea de puntos – ajuste a un modelo que no es de 2 estados (las trazas se superponen de forma que la traza de puntos no se puede observar)

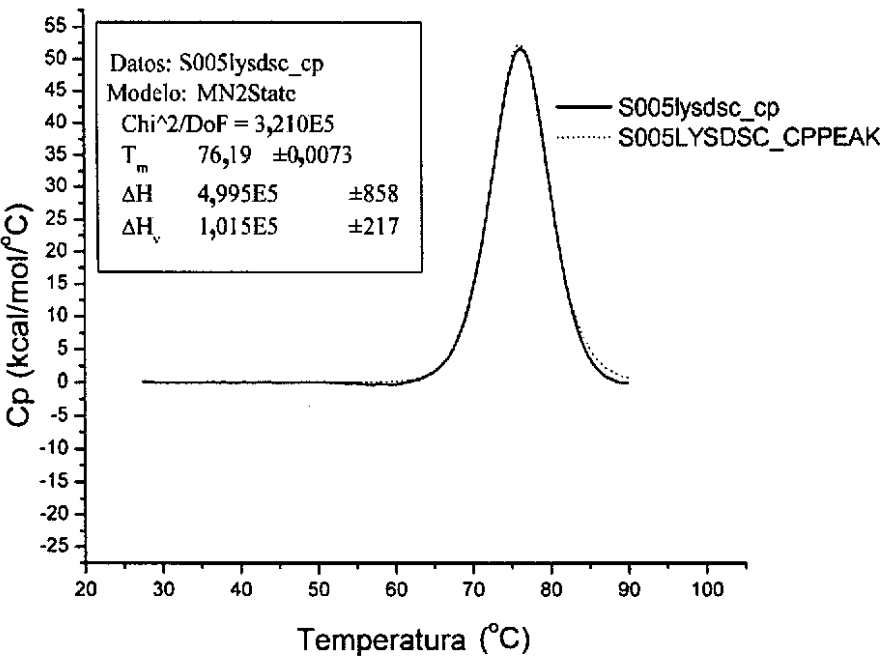
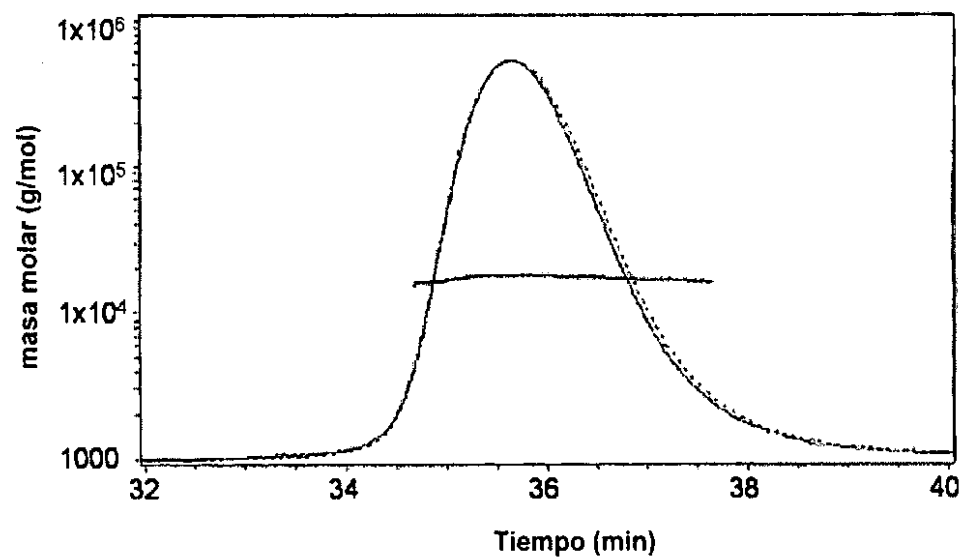
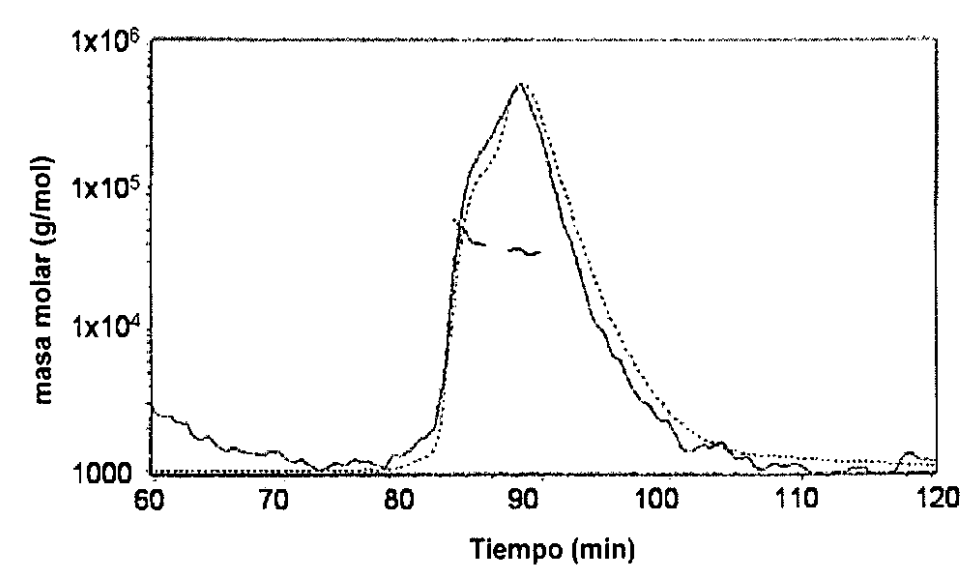


Figura 6: SEC MALLS de DAT0115



	Pico 1
Polidispersión	
Mw/Mn	Mw/Mn
Mz/Mn	Mz/Mn
Momentos de masa molar (g/mol)	
Mn	1,741e+4 (1%)
Mw	1,743e+4 (1%)
Mz	1,744e+4 (3%)
Límites de pico (min)	34,682 - 37.664
Masa inyectada (g)	1,0000e-4
Masa Calculada (g)	9,9398e-5

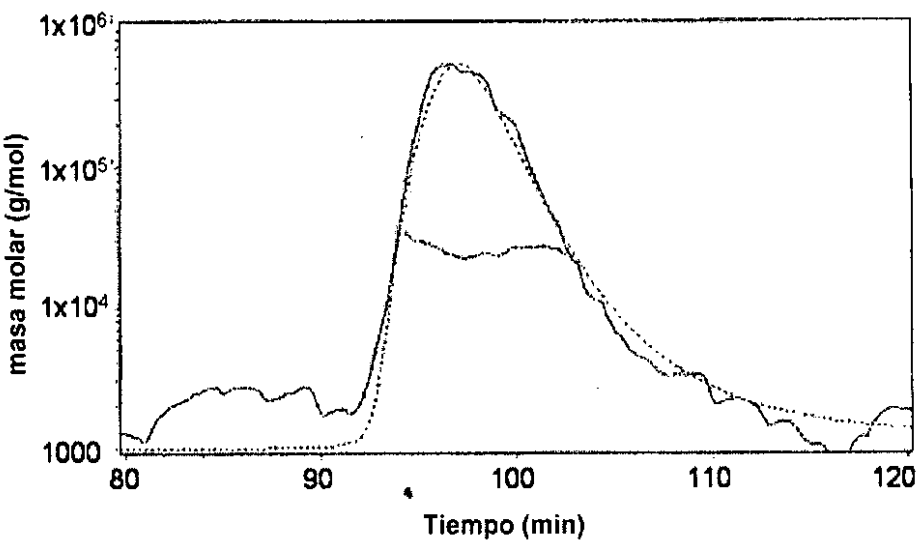
Figura 7: SEC MALLS de DAT0117



	Pico 1	Pico 2
Polidispersión		
Mw/Mn	1,017 (25%)	1,001 (17%)
Mz/Mn	1,037 (46%)	1,003 (30%)
Momentos de masa molar (g/mol)		
Mn	4,378e+4 (17%)	3,471e+4 (12%)
Mw	4,454e+4 (18%)	3,475e+4 (12%)
Mz	4,538e+4 (42%)	3,480e+4 (27%)
Límites de pico (min)	8,311 - 8,564	8,728 - 8,992
Masa inyectada (g)	2,0000e-4	
Masa calculada (g)	2,2014e-5	3,5001e-5

76

Figura 8: SEC MALLS de DAT0120



	Pico 1
Polidispersión	
Mw/Mn	1,009 (16%)
Mz/Mn	1,019 (29%)
Momentos de masa molar (g/mol)	
Mn	2,532e+4 (11%)
Mw	2,555e+4 (12%)
Mz	2,579e+4 (26%)
Límites de pico (min)	9,447 - 10,272
Masa inyectada (g)	1,5500e-4
Masa calculada (g)	6,3720e-5

177

Figura 9: Secuencia de aminoácidos de líderes

(a) ompA (obtenido de *E. coli*)

MKKTAIAIAVALAGFATVAQA

(SEC ID N° 34)

(b) ompA-AMA (secuencia artificial)

MKKTAIAIAVALAGFATVAMA (secuencia artificial)

(SEC ID N° 35)

(c) ompA-AWA (secuencia artificial)

MKKTAIAIAVALAGFATVAWA (secuencia artificial)

(SEC ID N° 36)

(d) ompT (obtenido de *E. coli*)

MRAKLLGIVLTTPIAISSFA (*E. coli*)

(SEC ID N° 37)

(e) ompT-AMA (secuencia artificial)

MRAKLLGIVLTTPIAISAMA (secuencia artificial)

(SEC ID N° 38)

(f) GAS (obtenido de *S. cerevisiae*)

MLFKSLSKLATAAFFAGVATA (*S. cerevisiae*)

(SEC ID N° 39)

Figura 9 continuación:

(g) GAS-AMA (secuencia artificial)

MLFKSLSKLATAAFFAGVAMA (secuencia artificial)

(SEC ID N° 40)

(h) GAS-AWA (secuencia artificial)

MLFKSLSKLATAAFFAGVAWA (secuencia artificial)

(SEC ID N° 41)

(i) Pel B (*Erwinia carotovora*)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

(SEC ID N° 46)

(j) secuencia señal Mal E

MKIKTGARILALSALTTMMFSASALA

(SEC ID N° 49)

Figura 10: DMS7139 purificado analizado mediante espectrometría de masas

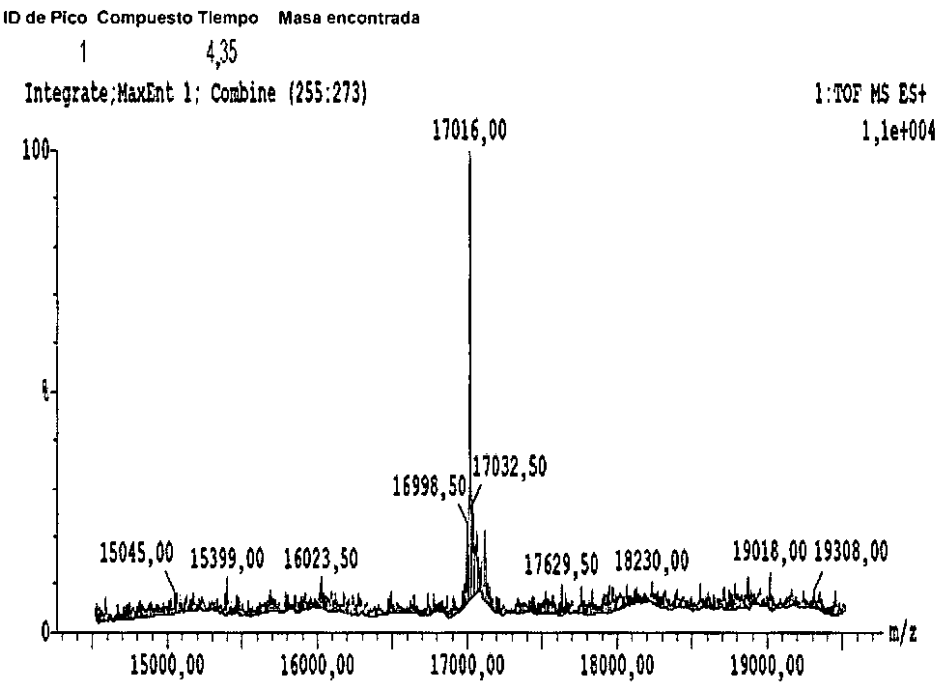


Figura 11 Una ilustración de la significación estadística de la reducción de glucosa en sangre incluyendo comparaciones entre DAT0115 y control, DMS7139 y control y entre DMS7139 y DAT0115, (a) muestra diseño de estudio (b) representación gráfica de ABC de glucosa.

(a)

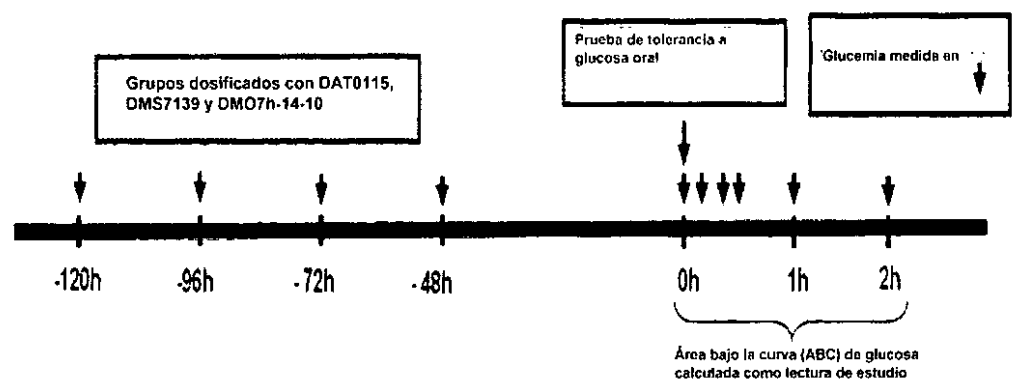


Figura 11b continuación:

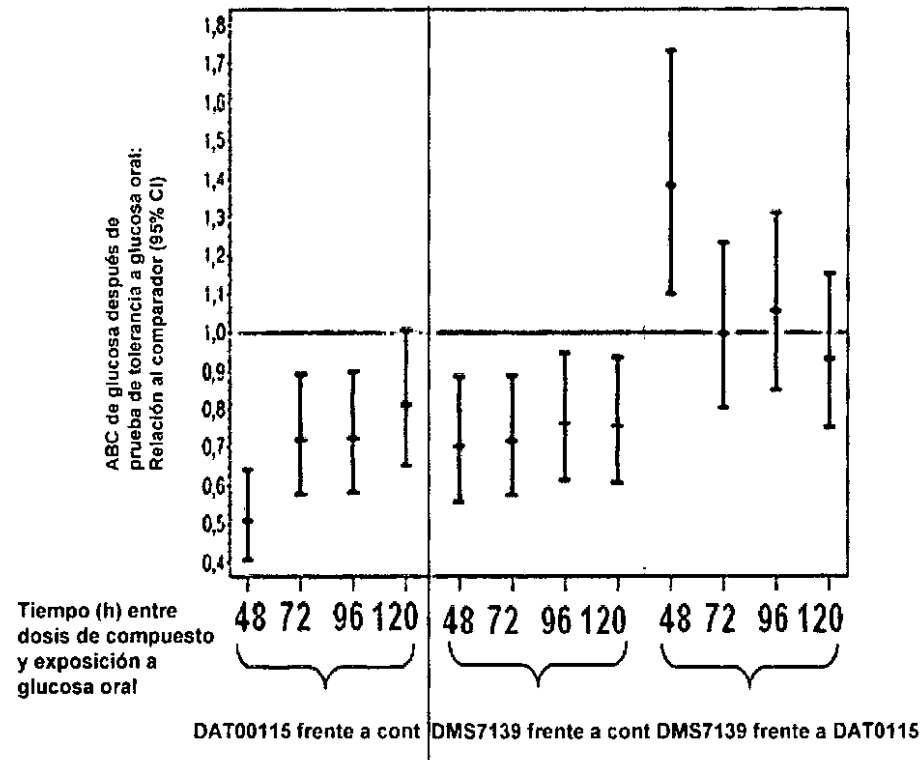
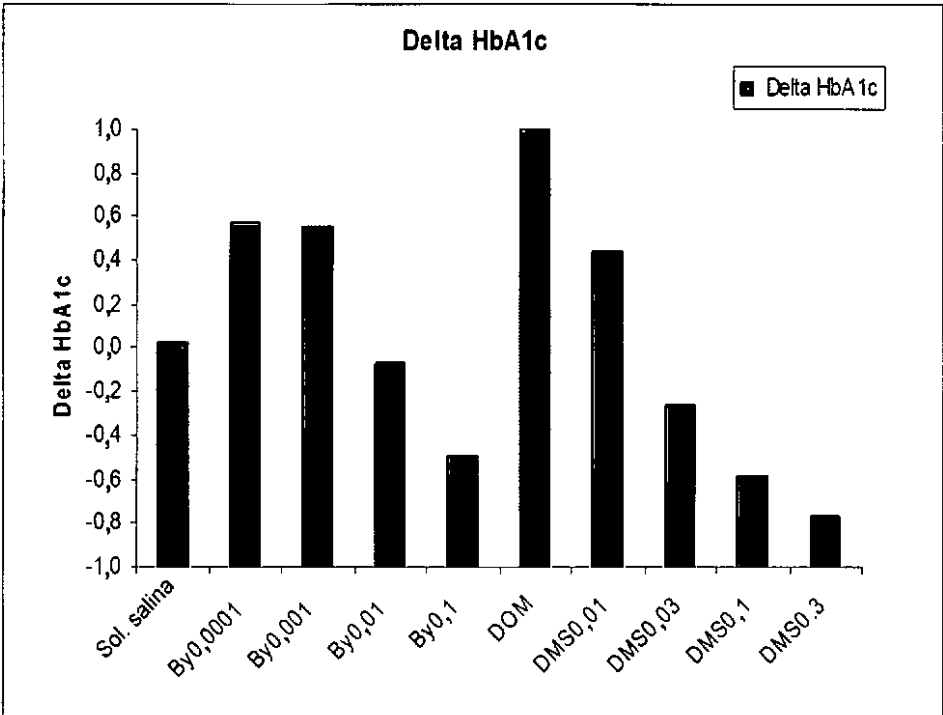


Figura 12: La repetición de dosis de DMS7139 muestra reducción dependiente de la dosis de HbA1c en comparación con control de DOM7h-14



Clave: By: Byetta DOM: DOM7h-14 DMS: DMS7139

183

Figura 13: DAT0115 y DMS7139 muestran reducción dependiente de la dosis en el consumo de alimentos y peso corporal en comparación con el control de DOM7h-14 en modelo de obesidad de ratón DIO.

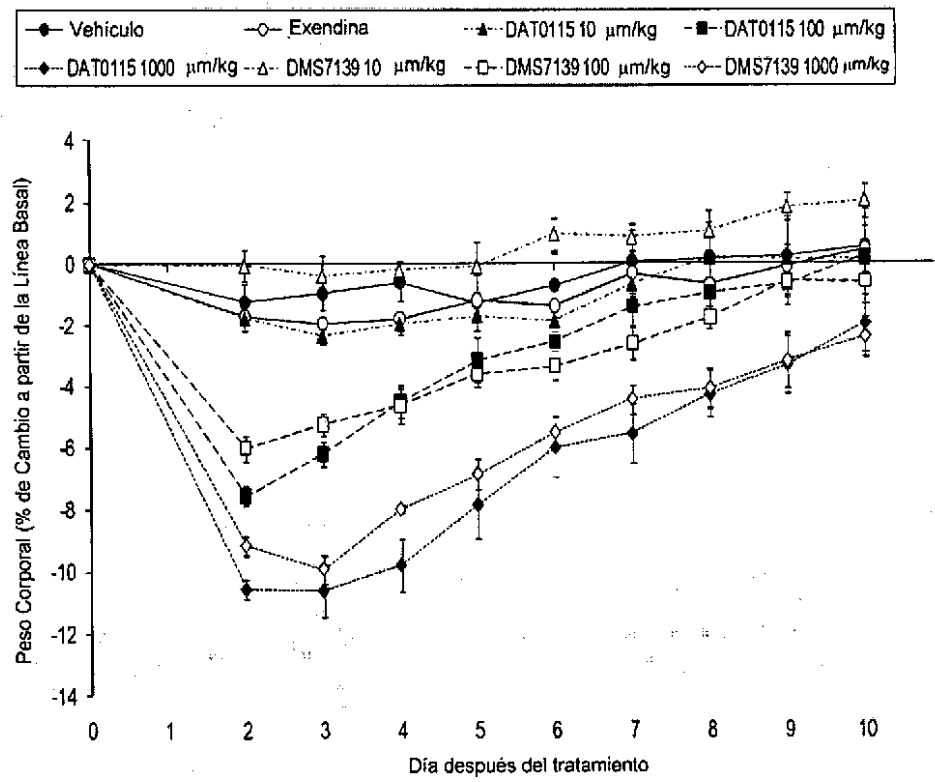
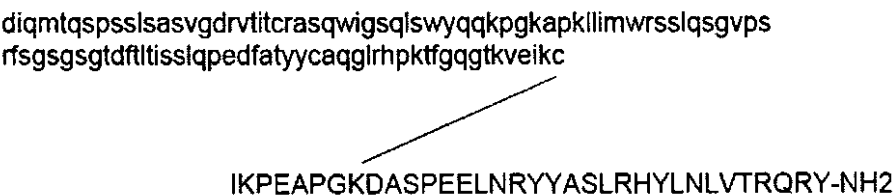


Figura 14:

Un conjugado peptídico que es:
un albudab Dom7h-14-10 (R108C) conjugado a un PYY3-36 amidado en el extremo C a través de una lisina (introducida en la posición 10 de PYY) y un engarce de PEG de 4 repeticiones. La línea presenta el engarce que está unido covalentemente a la cisteína C terminal libre de AlbudAb Dom7h-14-10 (R108C) y la lisina en posición 10 de la secuencia de PYY. La secuencia de aminoácidos y estructura de este conjugado peptídico es la siguiente



(SEC ID N°: 37)

Donde la | indica el engarce químico

El engarce químico tiene la siguiente estructura:

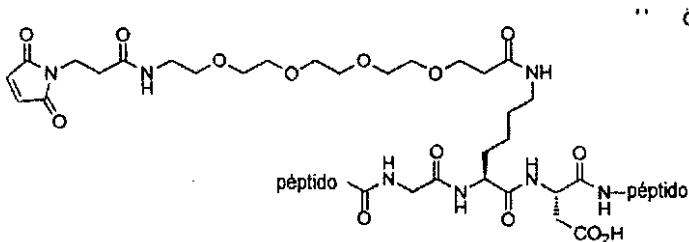
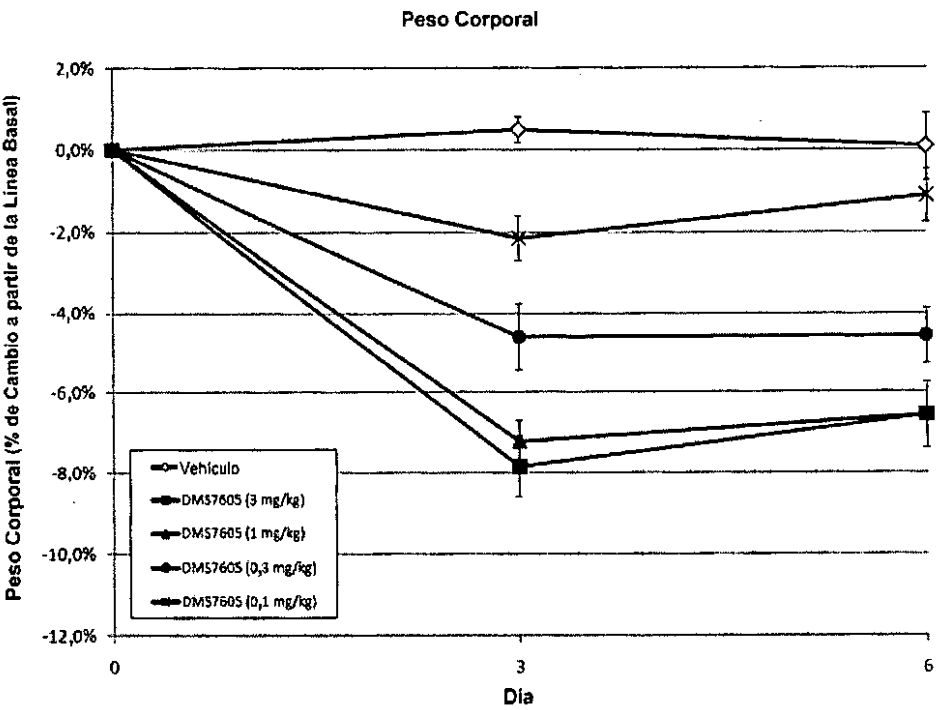


Figura 15: DMS7605 mostró una reducción dependiente de la dosis en el peso corporal en comparación con el control de vehículo



Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(I) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii)). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to international application No. PCT/EP2010/053806

GLAXO GROUP LIMITED is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

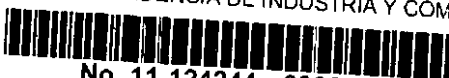
- (i) transfer of entitlement from inventors *Christopher HERRING; Lucy J HOLT; Laurent S JESPERs; Sebastian MAYER and Malgorzata PUPECKA* to GlaxoSmithKline Services Unlimited by way of employment contract
- (ii) an assignment from GlaxoSmithKline Services Unlimited to Glaxo Group Limited effective 27 March 2009

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (ii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form

1137



PATENTE DE INVENCION ☐ **MODELO DE**

- ☐ Indicación que solicita una patente
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

- (1) ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - (19) ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
 - (188) ☒ Dibujos de ser estos pertinentes.
 - (2) ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación grafica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐