

PROTEÍNAS DE FUSIÓN

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a proteínas de
5 fusión para uso en el tratamiento de la diabetes. Más
particularmente, la invención se refiere a proteínas de fusión
que comprenden un agonista del receptor de insulina fusionado
a una región Fc de IgG humana con un enlazante de péptido, y
el uso de tales proteínas en el tratamiento de la diabetes. Las
10 proteínas de fusión de la presente invención tienen un perfil
de acción de tiempo prolongado y son útiles para proporcionar
control de la glucosa basal prolongada y supresión de la
producción de glucosa hepática.

La diabetes mellitus es un trastorno crónico
15 caracterizado por hiperglucemia resultante de defectos en la
secreción de insulina, acción de la insulina, o ambas. La
diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por la escasa o nula
capacidad de secreción de la insulina, y los pacientes con
diabetes mellitus tipo 1 requieren insulina para sobrevivir.
20 La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por niveles elevados
de glucosa en sangre resultantes de la secreción de insulina
alterada, resistencia a la insulina, producción excesiva de
glucosa hepática, y/o contribuciones de todas las anteriores.
En al menos un tercio de los pacientes con diabetes mellitus
25 tipo 2, la enfermedad progresa a un requisito absoluto de la

terapia de insulina.

Para lograr la glucemia normal, se desea la terapia de reemplazo de insulina en paralelo, muy estrechamente posible, con el patrón de secreción de insulina endógena en
5 individuos normales. La demanda fisiológica diaria de la insulina fluctúa y se puede separar en dos fases: (a) la fase de la hora de comer que requiere un pulso (bolo) de insulina para disponer de la oleada de glucosa en sangre relacionada con la comida, y (b) la fase entre comidas que requiere una cantidad
10 sostenida (basal) de insulina para regular la salida de glucosa hepática para mantener la glucosa en sangre en ayunas óptima.

Debido a que los pacientes con diabetes tipo 1 producen poca o ninguna insulina, la terapia de insulina efectiva para diabéticos tipo 1 generalmente implica el uso de
15 dos tipos de insulina administrada exógenamente: una insulina a la hora de la comida de acción rápida, proporcionada por inyecciones de bolo y una insulina basal de acción prolongada, administrada una vez o dos veces al día para controlar los niveles de glucosa en sangre entre las comidas. El tratamiento
20 de pacientes con diabetes tipo 2 típicamente comienza con la pérdida de peso prescrita, ejercicio y una dieta para diabéticos, pero cuando estas medidas no controlan el azúcar en la sangre elevada, entonces la terapia a base de incretina y medicamentos orales, tal como la administración de agonistas
25 del receptor de péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y/o

inhibidores de dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) que permiten niveles de incretina aumentados, puede ser necesaria. Cuando estos medicamentos son aún insuficientes, se considera el tratamiento con insulina. Los pacientes con diabetes tipo 2
5 cuya enfermedad ha progresado hasta el punto que se requiere la terapia de insulina generalmente inician con una inyección diaria única de una insulina basal de acción prolongada, aunque se pueden incluir, como sea necesario, inyecciones a la hora de la comida de insulinas de acción rápida en algunos casos.

10 Varios tipos de insulinas basales están actualmente disponibles. La insulina glargina, vendida bajo el nombre comercial LANTUS®, comprende una estructura de insulina modificada en la cual la asparagina en la posición 21 en la cadena A de insulina se reemplaza con glicina, y dos argininas
15 se añaden al extremo C terminal de la cadena B. La insulina detemir, vendida bajo el nombre comercial LEVEMIR®, comprende una estructura de insulina modificada en la cual la treonina en la posición 30 de la cadena B se ha suprimido y la lisina en la posición 29 de la cadena B se ha derivado a través del
20 enlace covalente de un ácido graso de miristoilo de 14 carbonos al grupo ϵ -amina de lisina en B29. La insulina degludec, disponible en Europa y Japón bajo el nombre comercial TRESIBA®, comprende una estructura de insulina modificada en la cual la treonina en la posición 30 de la cadena B se ha suprimido, y
25 el grupo ϵ -amino de la lisina en la posición 29 de la cadena B

se deriva covalentemente con ácido hexadecandioico a través de un enlazante de ácido γ -L-glutámico. Todas estas insulinas se indican para la administración una vez al día.

Los regímenes de tratamiento que implican inyecciones
5 diarias de terapias de insulina existentes pueden ser complicados y dolorosos de administrar y pueden resultar en efectos secundarios no deseados, tales como hipoglucemia y ganancia de peso. Por lo tanto, muchos pacientes diabéticos no están dispuestos o son incapaces de cumplir, con la terapia de
10 insulina necesaria para mantener un estrecho control de los niveles de glucosa en sangre. Un pobre control glucémico aumenta el riesgo de un paciente de desarrollar complicaciones graves relacionadas con la diabetes, incluyendo enfermedades del corazón, apoplejía, daño a los nervios, amputación de miembros
15 inferiores, pérdida de visión, y enfermedad renal. Se está realizando investigación para identificar productos de insulina con duración de acción más prolongada; por lo tanto, lo que requiere un menor número de inyecciones que los productos de insulina actualmente disponibles para mejorar la aceptación
20 y cumplimiento.

CN103509118 describe proteínas con una cadena B de insulina humana y cadena A de insulina humana unidas por una secuencia de conexión de péptido C de 4 a 50 aminoácidos, y con la cadena A de insulina unida directamente, sin un enlazante n
25 adicional, a un fragmento Fc de inmunoglobulina, e indica que

las pruebas en ratones muestran que tales proteínas tienen una vida media in vivo tanto tiempo como aproximadamente 3 días. KR101324828 describe análogos de proinsulina enlazados a regiones Fc de inmunoglobulina mediante el uso de enlazantes no peptídico, e indica que tales proteínas proporcionan una vida media aumentada sobre las terapias existentes. La publicación indica que los enlazantes no peptídico representan una mejora sobre los enlazantes de péptido, afirmando que las proteínas de fusión que usan enlazantes de péptido no pueden aumentar la vida media de un medicamento activo en la sangre debido a que los enlazantes de péptido son fácilmente cortados por las enzimas en el cuerpo.

A pesar de las descripciones anteriores, y/o en cualesquiera otras publicaciones, los presentes inventores superaron múltiples obstáculos para descubrir proteínas de fusión que comprenden agonistas del receptor de insulina, enlazantes de péptido, y regiones Fc de IgG humana que cumplen con la necesidad continua de un producto de disminución de glucosa con duración de acción aumentada, suficiente para la dosificación menos frecuente que productos de insulina actualmente disponibles, incluyendo la dosificación tan poco frecuente como una vez a la semana. Por ejemplo, para lograr el perfil de acción de tiempo prolongado deseado, fue necesario diseñar proteínas de fusión con la potencia atenuada para evitar la depuración rápida mediada por receptor, una ruta principal

de depuración de insulina, pero que todavía tendrá suficiente potencia para proporcionar suficiente disminución de glucosa. Además, para minimizar la depuración renal, la otra ruta principal de depuración de insulina, y para regular la

5 exposición periférica a través de la difusión paracelular de tamaño limitado hidrodinámica, las proteínas de fusión tuvieron que ser diseñadas, las cuales fueron lo suficientemente grandes, y las cuales no tendrían el agonista del receptor de insulina proteolíticamente escindido de la región Fc de IgG

10 humana después de ser administrado, como tal escisión resultaría más rápida que la depuración renal deseada del agonista del receptor de insulina, incluso si la región Fc de IgG humana permaneció en circulación. Además, los dominios Fc de IgG han evolucionado para auto-asociarse para formar dímeros

15 estables, y cuando tal dímero se forma de dos proteínas de fusión, cada una comprende una porción de insulina fusionada con una región Fc de IgG, las dos porciones de insulina se ponen en estrecha proximidad entre sí, habilitando la auto-asociación o dimerización, de las porciones de insulina,

20 mediada a través de las regiones de auto-asociación de cadena B de insulina. Tales dímeros de insulina son inactivos, de modo que las proteínas de fusión con auto-asociación reducida de las porciones de agonista del receptor de insulina tienen que ser diseñadas. Múltiples desafíos adicionales se superaron para

25 crear una proteína de fusión adecuada para la manufactura

comercial y formulación como un agente terapéutico. La presente invención proporciona proteínas de fusión las cuales tienen duración de acción prolongada en comparación con los tratamientos de insulina existentes, que permite inyecciones
 5 menos frecuentes que los productos de insulina existentes, incluyendo hasta una vez a la semana, reduciendo así la complejidad y dolor asociado con los regímenes de tratamiento existentes que implica inyecciones más frecuentes. Las proteínas de fusión de la presente invención tienen un perfil
 10 farmacocinético plano y exposición periférica restringida, lo que resulta en una baja variabilidad día a día, e incidencia mínima de hipoglucemia, incluyendo cuando se proporciona en combinación con un medicamento adicional para la diabetes, tal como una terapia a base de incretina. Las proteínas de fusión
 15 de la presente invención también pueden proporcionar duración de acción prolongada sin causar ganancia de peso.

La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende:

- a) un agonista del receptor de insulina que tiene
 20 la fórmula general $Z_1-Z_2-Z_3$, en donde
 - i) Z_1 es un análogo de la cadena B de insulina, que comprende la secuencia de aminoácidos:

$X_1X_2X_3QHLGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

25 en donde X_1 es F, Q o A; X_2 es V o G; X_3 es N, K, D, G, Q, A o

E; X₄ es E, Y, Q, o H; X₅ es H o F; X₆ es G, T, S, H, V o está ausente; X₇ es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X₈ es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X₉ es G, T, S, E, K, A o está ausente, siempre que el análogo de la cadena B de insulina
 5 incluya al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, o X₉ (SEC ID NO: 1);

ii) Z₂ es un primer enlazante de péptido que comprende 5 a 10 aminoácidos, en donde al
 10 menos 5 de los aminoácidos son residuos G; y

iii) Z₃ es un análogo de la cadena A de insulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

15 GIVEQCCTSX₁CSLX₂QLENYCX₃X₄

X₁ es T o I; X₂ es D, Y, Q o E; X₃ es G, N, S o A; y X₄ es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que si X₃ es N, entonces X₄ debe ser un aminoácido diferente de G o N (SEC ID NO: 2);

20 b) un segundo enlazante de péptido; y

c) una región Fc de IgG humana;

en donde el residuo C-terminal del agonista del receptor de insulina se fusiona directamente al residuo N-terminal del segundo enlazante de péptido, y el residuo C-terminal del
 25 segundo enlazante de péptido se fusiona directamente al residuo

N-terminal de la región Fc de IgG.

La presente invención también proporciona una proteína de fusión que consiste de:

5 a) un agonista del receptor de insulina que tiene la fórmula general $Z_1-Z_2-Z_3$, en donde

i) Z_1 es un análogo de la cadena B de insulina, que tiene la secuencia de aminoácidos:

$X_1X_2X_3QHLGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

10 en donde X_1 es F, Q o A; X_2 es V o G; X_3 es N, K, D, G, Q, A o E; X_4 es E, Y, Q, o H; X_5 es H o F; X_6 es G, T, S, H, V o está ausente; X_7 es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X_8 es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X_9 es G, T, S, E, K, A o está ausente, siempre que el análogo de la cadena B de insulina
15 incluya al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , o X_9 (SEC ID NO: 1);

20 ii) Z_2 es un primer enlazante de péptido que comprende 5 a 10 aminoácidos, en donde al menos 5 de los aminoácidos son residuos G; y

iii) Z_3 es un análogo de la cadena A de insulina que tiene la secuencia de aminoácidos:

25 $GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

X_1 es T o I; X_2 es D, Y, Q o E; X_3 es G, N, S o A; y X_4 es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que si X_3 es N, entonces X_4 debe ser un aminoácido diferente de G o N (SEC ID NO: 2);

5 b) un segundo enlazante de péptido; y

 c) una región Fc de IgG humana;

en donde el residuo C-terminal del agonista del receptor de insulina se fusiona directamente al residuo N-terminal del segundo enlazante de péptido, y el residuo C-terminal del
10 segundo enlazante de péptido se fusiona directamente al residuo N-terminal de la región Fc de IgG.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de la presente invención y al menos un excipiente
15 farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un método para tratar un paciente con diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia o síndrome metabólico, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad
20 terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención. La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir una afección relacionada con la diabetes seleccionada del grupo que consiste de enfermedad cardiaca, apoplejía, nefropatía, retinopatía, y enfermedad
25 renal, que comprende administrar a un paciente en necesidad del

mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención.

La invención también proporciona una proteína de fusión de la presente invención para uso en terapia.

5 La presente invención también proporciona el uso de una proteína de fusión de la presente invención en la manufactura de un medicamento.

La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de la
10 presente invención.

La presente invención también proporciona un proceso para producir una proteína de fusión de la presente invención, el proceso comprende las etapas de:

1. cultivar una célula huésped de mamífero que
15 comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de la presente invención bajo condiciones de modo que la proteína de fusión se expresa; y
2. recuperar de la célula huésped una proteína de
20 fusión;

La presente invención también proporciona una proteína de fusión producida por el proceso descrito anteriormente.

Figura 1. La **Figura 1** proporciona datos
25 farmacodinámicos de proteínas de fusión ejemplares de la

presente invención en un modelo de diabetes en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ).

Figura 2. La **Figura 2** proporciona un diagrama esquemático de configuraciones de proteínas descritas en la presente. Se debe señalar que las formas particulares (por ejemplo, ovalos, semi-círculos, etc.) usadas en los diagramas en la Figura 2 no se pretende que describan o caractericen, y no se deben usar para interpretar, el significado o estructura de los componentes individuales de las proteínas de fusión de la presente invención.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄ o X₅ de SEC ID NO: 1, y al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos dos modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, y X₉ de SEC ID NO: 1.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de

insulina tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 en donde X_6 - X_9 son cada uno G.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X_4 y X_5 de SEC ID NO: 1.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X_1 es F; X_2 es V; X_3 es N o D; X_4 es E; X_5 es H.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye la modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en cada una de las posiciones X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , y X_9 de SEC ID NO: 1.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X_1 es F; X_2 es V; X_3 es N o D; X_4 es E; X_5 es H; y X_6 - X_9 son cada uno G.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X_1 o X_2 de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X_1 como X_2 de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena A de
5 insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde X₃ es N y en donde X₄ es un aminoácido diferente de G, N, S, V, L o P.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana
10 en X₄ o X₅ de SEC ID NO: 1, y al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana
15 en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos dos modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A
20 de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos
25 de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈,

y X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 en donde X₆-X₉ son cada uno G; y el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄ y X₅ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X₁ es F; X₂ es V; X₃ es N o D; X₄ es E; X₅ es H; y el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye la modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en cada una de las posiciones X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, y X₉ de SEC ID NO: 1; y el

análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X₁ es F; X₂ es V; X₃ es N o D; X₄ es E; X₅ es H; y X₆-X₉ son cada uno G; y el análogo de la cadena A de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana en X₁ o X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄ o X₅ de SEC ID NO: 1, y al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos dos modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, y X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 en donde X₆-X₉ son cada uno G; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄ y X₅ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X₁ es F; X₂ es V; X₃ es N o D; X₄ es E; X₅ es H; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye la modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en cada una de las posiciones X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, y X₉ de SEC ID NO: 1; y el
5 análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X₁ es F; X₂ es V; X₃ es N o D; X₄ es E; X₅ es H; y X₆-X₉ son cada uno G; y el análogo de la cadena A de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana tanto en X₁ como X₂ de SEC ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄ o X₅ de SEC ID NO: 1, y al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo
15 de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos dos modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, o X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A
25

de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₆, X₇, X₈, y X₉ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 en donde X₆-X₉ son cada uno G, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄ y X₅ de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X₁ es F; X₂ es V; X₃ es N o D; X₄ es E; X₅ es H; y el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X₁ es I o T; X₂ es D; X₃ es G; y X₄ está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina incluye la modificación de la secuencia de aminoácidos

de la cadena B de una molécula de insulina humana en cada una de las posiciones X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , y X_9 de SEC ID NO: 1; y el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X_1 es I o T; X_2 es D; X_3 es G; y X_4 está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X_1 es F; X_2 es V; X_3 es N o D; X_4 es E; X_5 es H; y X_6 - X_9 son cada uno G; y el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X_1 es I o T; X_2 es D; X_3 es G; y X_4 está ausente.

En ciertas modalidades, el primer enlazante de péptido (Z_2) comprende la secuencia de aminoácidos: X_1GX_2GGGG , en donde X_1 es G o está ausente; y X_2 es G, S o está ausente (SEC ID NO: 3).

En ciertas modalidades, el agonista del receptor de insulina, es decir, Z_1 - Z_2 - Z_3 en la proteína de fusión descrita anteriormente, comprende la secuencia de aminoácidos:

$X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9X_{10}GX_{11}GGGGGIVEQCCTSX_{12}CSLX_{13}QLENYCX_{14}X_{15}$

en donde X_1 es F, Q o A; X_2 es V o G; X_3 es N, K, D, G, Q, A o E; X_4 es E, Y, Q, o H; X_5 es H o F; X_6 es G, T, S, H, V o está ausente; X_7 es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X_8 es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X_9 es G, T, S, E, K, A o está ausente; X_{10} es G o está ausente; X_{11} es G, S o está ausente; X_{12}

es T o I; X_{13} es D, Y, Q o E; X_{14} es G, N, S o A; y X_{15} es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que al menos uno de X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , o X_9 deba ser un aminoácido diferente que el encontrado, respectivamente, en la posición

5 B_{16} , B_{25} , B_{27} , B_{28} , B_{29} o B_{30} de la cadena B de una molécula de insulina humana, y además siempre que si X_{14} es N, entonces X_{15} debe ser un aminoácido diferente de G o N (SEC ID NO: 4).

En ciertas modalidades preferidas, el agonista del receptor de insulina, es decir, Z_1 - Z_2 - Z_3 en la proteína de fusión

10 descrita anteriormente tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG

(SEC ID NO: 5).

En ciertas modalidades, el segundo enlazante de

15 péptido es un péptido que tiene entre 10 y 25 aminoácidos, en donde al menos 50% de los aminoácidos son residuos G. En ciertas modalidades, el segundo enlazante de péptido es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos $[GGGGX]_n$, en donde X es Q, E o S; y en donde n es 2-5. En ciertas modalidades, el

20 segundo enlazante de péptido comprende la secuencia de aminoácidos:

GGGGX₁GGGGX₂GGGGX₃GGGGX₄X₅X₆

en donde X_1 es Q o E; X_2 es Q o E; X_3 es Q o E; X_4 es G, E, Q o está ausente; X_5 es G o está ausente; y X_6 es G o está ausente

25 (SEC ID NO: 6).

En ciertas modalidades preferidas, el segundo
enlazante de péptido tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEC ID NO: 7).

En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana
5 comprende fragmentos de una cadena pesada de un anticuerpo de
IgG. Un diagrama esquemático de una proteína de fusión que
comprende tal región de IgG se proporciona en el diagrama (A)
en la Figura 2. En otras modalidades, la región Fc de IgG humana
comprende fragmentos de dos cadenas pesadas de un anticuerpo
10 de IgG. Un diagrama esquemático de una proteína de fusión que
comprende tal región de IgG se proporciona en el diagrama (B)
en la Figura 2.

En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana
es una región Fc de un anticuerpo de IgG1, IgG2 o IgG4.

15 En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana
es una región Fc de un anticuerpo de IgG1 que comprende la
siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPELLGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
20 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGX₆

en donde X₁ es F, Q o E; X₂ es F, Q o E; X₃ es V o T; X₄ es V o
T; X₅ es N, D o Q; y

X₆ es K o está ausente. (SEC ID NO: 8)

25 En ciertas modalidades, la región Fc de IgG comprende

la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8 y además comprende algunos o todos los aminoácidos que se encontrarían en una secuencia de Fc de IgG1 tipo salvaje al lado N-terminal del residuo C en la posición 1 en la SEC ID NO: 8.

5 Preferiblemente, la región Fc de IgG humana es De un anticuerpo ya sea de IgG2 o IgG4.

En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana es una región Fc de un anticuerpo de IgG4 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

10 PCPPCPAPEAAGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSX₆LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGX₇

en donde X₁ es F, Q o E; X₂ F, Q o E; X₃ es V o T; X₄ es V o T;
15 X₅ es N, D o Q; X₆ es R, o K; X₇ es K o está ausente. (SEC ID
NO: 9)

En ciertas modalidades, la región Fc de IgG comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, y además comprende algunos o todos los aminoácidos que se encontrarían en una
20 secuencia de Fc de IgG4 tipo salvaje al lado N-terminal del residuo C en la posición 1 en la SEC ID NO: 9. En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, en donde X₁ es F; X₂ es F; X₃ es V; X₄ es V; X₅ es N; X₆ es R; y X₇ está ausente.

25 En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana

es una región Fc de un anticuerpo de IgG2 que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ECPPCPAPPVAGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFX₅STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE
5 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX₆

en donde X₁ es F, Q o E; X₂ es F, Q o E; X₃ es V o T; X₄ es V o T; X₅ es N, D o Q; y X₆ es K o está ausente. (SEC ID NO: 10)

En ciertas modalidades, la región Fc de IgG comprende
10 la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10, y además comprende algunos o todos los aminoácidos que se encontrarían en una secuencia de Fc de IgG2 tipo salvaje al lado N-terminal del residuo E en la posición 1 en la SEC ID NO: 10. En ciertas modalidades, la región Fc de IgG humana comprende la secuencia
15 de aminoácidos de SEC ID NO: 10, en donde X₁ es F; X₂ es F; X₃ es V; X₄ es V; X₅ es N; y X₆ está ausente.

En ciertas modalidades, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos:

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁GGGGGIVEQCCTSX₁₂CSLX₁
20 ₃QLENYCX₁₄X₁₅GGGGX₁₆GGGGX₁₇GGGGX₁₈GGGGX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂CPPCPAPX₂₃X₂₄AGX₂₅PS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSX₂₆EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
X₂₇RVVSVLTVX₂₈HQDWLNGKEYKCKVSNKGLP₂₉X₃₀IEKTISKX₃₁KGQPREPQVYTLPPS
X₃₂EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX₃₃LDSDGSFFFLYSX₃₄LT
VDKSRWQX₃₅GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSX₃₆G

25 en donde X₁ es F, Q o A; X₂ es V o G; X₃ es N, K, D, G, Q, A o

E; X₄ es E, Y, Q, o H; X₅ es H o F; X₆ es G, T, S, H, V o está ausente; X₇ es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X₈ es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X₉ es G, T, S, E, K, A o está ausente, siempre que al menos uno de X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, o X₉ sea un aminoácido diferente del que está presente, respectivamente, en la posición B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ o B₃₀ de una cadena B de insulina humana; X₁₀ es G o está ausente; X₁₁ es G, S o está ausente; X₁₂ es T o I; X₁₃ es D, Y, Q o E; X₁₄ es G, N, S o A; X₁₅ es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que si X₁₄ es N, entonces X₁₅ debe ser un aminoácido diferente de G o N; X₁₆ es Q o E; X₁₇ es Q o E; X₁₈ es Q o E; X₁₉ es G, E, Q o está ausente; X₂₀ es G o está ausente; X₂₁ es G o está ausente; X₂₂ es E o P; X₂₃ es E o P; X₂₄ es A o V; X₂₅ es G o está ausente; X₂₆ es Q o H; X₂₇ es Y o F; X₂₈ es L o V; X₂₉ es S o A; X₃₀ es S o P; X₃₁ es A o T; X₃₂ es Q o R; X₃₃ es V o M; X₃₄ es R o K; X₃₅ es E o Q; y X₃₆ es L o P (SEC ID NO: 11).

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, y SEC ID NO: 24.

En una modalidad preferida, la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos:

10	20	30	40	50	60
----	----	----	----	----	----

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
 70 80 90 100 110 120
 GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 130 140 150 160 170 180
 5 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 190 200 210 220 230 240
 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 250 260 270 280 290
 ENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 10 (SEC ID NO: 12).

En ciertas modalidades, las proteínas de fusión de la presente invención están presentes en la forma de un dímero. Un diagrama esquemático de tal dímero se proporciona en el diagrama (C) en la Figura 2. En ciertas modalidades, el dímero es un homodímero, en donde las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas de fusión que integran el dímero son las mismas. En ciertas modalidades, el dímero es un heterodímero, en donde las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas de fusión que integran el dímero son diferentes.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención comprende una proteína de fusión de la presente invención, un agente amortiguador, un tensioactivo, y un agente de isotonicidad. En ciertas modalidades, el agente amortiguador es ácido cítrico y/o citrato, el tensioactivo es

polisorbato 80, y el agente de isotonicidad es manitol. En ciertas modalidades, el pH de la composición varía desde aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8.0. En ciertas modalidades, el pH varía desde aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.4. En ciertas modalidades, el pH varía desde aproximadamente 6.0 a 6.75.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica comprende además un ingrediente activo adicional. En ciertas modalidades, el ingrediente activo adicional es una terapia basada en la incretina. En ciertas modalidades preferidas, la terapia basada en la incretina es un agonista de GLP-1R. Preferiblemente, el agonista de GLP-1R es dulaglutida.

En ciertas modalidades, el método de la presente invención comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión una vez al día. En modalidades preferidas, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión se administra una vez a la semana. En ciertas modalidades, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión se administra una vez al mes. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar un paciente con diabetes mellitus mientras se reduce el riesgo de hipoglucemia y/o ganancia de peso, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método

para tratar un paciente con diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención en combinación con un
5 ingrediente activo adicional. La proteína de fusión y el ingrediente activo adicional en tales modalidades se pueden administrar simultánea, secuencialmente o en una formulación combinada única. En ciertas modalidades, el ingrediente activo adicional es una terapia basada en la incretina. En ciertas
10 modalidades preferidas, la terapia basada en la incretina es un agonista de GLP-1R. Preferiblemente, el agonista de GLP-1R es dulaglutida. En ciertas modalidades, la combinación se administra una vez al día. En ciertas modalidades preferidas, la combinación se administra una vez a la semana. En ciertas
15 modalidades, la combinación se administra una vez al mes.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una proteína de fusión de la presente invención para uso en el tratamiento de diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia o síndrome metabólico. En ciertas modalidades, la
20 presente invención proporciona una proteína de fusión de la presente invención para uso en el tratamiento o prevención de una afección relacionada con la diabetes seleccionada del grupo que consiste de enfermedad cardíaca, apoplejía, nefropatía, retinopatía, y enfermedad renal. En ciertas modalidades, la
25 presente invención proporciona una proteína de fusión de la

presente invención para uso en el tratamiento de un paciente con diabetes mellitus mientras se reduce el riesgo de hipoglucemia y/o ganancia de peso, que comprende administrar al paciente una proteína de fusión de la presente invención.

5 En ciertas modalidades, la proteína de fusión de la presente invención se proporciona para uso en combinación simultánea, separada o secuencial con otro ingrediente activo. En ciertas modalidades, el ingrediente activo adicional es una terapia basada en la incretina. En ciertas modalidades preferidas, la
10 terapia basada en la incretina es un agonista de GLP-1R.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión de la presente invención en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia o
15 síndrome metabólico. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión de la presente invención en la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección relacionada con la diabetes seleccionada del grupo que consiste de enfermedad
20 cardíaca, apoplejía, nefropatía, retinopatía, y enfermedad renal. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión de la presente invención en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus mientras se reduce el riesgo
25 de hipoglucemia y/o ganancia de peso, que comprende administrar

al paciente una proteína de fusión de la presente invención. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión de la presente invención en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia o síndrome metabólico, en donde el medicamento será administrado simultánea, separada o secuencialmente en combinación con otro ingrediente activo.

Cuando se usa en la presente, el término "agonista del receptor de insulina" se refiere a una proteína que se une y activa el receptor de insulina, lo que resulta en una disminución de los niveles de glucosa en sangre y/o supresión de la producción de glucosa hepática, características que se pueden analizar y medir usando técnicas conocidas, tales como las mostradas en los estudios descritos a continuación.

La porción de agonista del receptor de insulina de las proteínas de fusión de la presente invención incluye un análogo de una cadena B de insulina y un análogo de una cadena A de insulina. Cuando se usan en la presente, los términos "cadena A de insulina" y "cadena B de insulina" se refieren a las cadenas A y B de la molécula de insulina humana (CAS No. 11061-68-0), cuyas secuencias tipo salvaje nativas son bien conocidas. La cadena A de insulina humana consiste de 21 aminoácidos, referidos en la técnica como A₁-A₂₁, que tienen la siguiente secuencia:

GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN (SEC ID NO: 13).

La cadena B de insulina humana consiste de 30 aminoácidos, referidos en la técnica como B₁-B₃₀, que tienen la siguiente secuencia:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEC ID NO: 14).

5 En una molécula de insulina humana, las cadenas A y B se unen por dos enlaces de disulfuro, CysA7-CysB7 y CysA20-CysB19. La cadena A tiene un enlace de disulfuro intra-cadena en CysA6-CysA11.

Para lograr el perfil de acción de tiempo prolongado
10 deseado, el agonista del receptor de insulina de la proteína de fusión de la presente invención debe permanecer en la circulación, y ser capaz de interactuar con el receptor de insulina, durante un período de tiempo prolongado. Para que las proteínas de fusión de la presente invención permanezcan en
15 circulación durante el período de tiempo deseado, la eliminación de las proteínas de fusión se debe atenuar. Las dos rutas primarias de eliminación de la insulina son depuración renal y depuración mediada por el receptor de insulina. Ver Iglesias P, et al. *Diabetes Obes. Metab.* 2008; 10: 811-823.
20 Para minimizar la depuración renal, se necesita una molécula con un tamaño hidrodinámico de al menos aproximadamente el tamaño de la albúmina de suero humano, y tal tamaño hidrodinámico se proporciona en las proteínas de fusión de la presente invención por la región Fc de IgG humana. Como para
25 la depuración mediada por receptor, la proteína de fusión no

puede ser tan potente en el receptor de insulina que resulte en la depuración mediada por receptor más rápida de lo deseado, pero la proteína de fusión debe ser bastante potente, sin embargo, para proporcionar suficiente control de la glucosa a 5 dosis que son comercialmente factibles. Por lo tanto, la potencia de la proteína de fusión debe ser cuidadosamente equilibrada, y la estructura de la proteína de fusión de la presente invención permite lograr tal equilibrio.

Las moléculas de insulina tienen una tendencia a la 10 auto-asociación en dímeros y hexámeros. Se han propuesto numerosos roles para las tendencias de auto-asociación conservadas evolutivamente, incluyendo: (1) estabilización química y térmica de la molécula durante el almacenamiento de vacuola intracelular; (2) protección de la insulina monomérica 15 de fibrilación in vivo; (3) sustitución de la estabilización asistida por chaperona y plegado durante la expresión intracelular; y/o (4) esencial para el tráfico secretor. La forma activa de la insulina, sin embargo, es el monómero.

La tendencia de las moléculas de insulina a auto- 20 asociarse, y la inactividad de tales moléculas auto-asociadas, es relevante para la presente invención, debido a que las regiones Fc de IgG humana también tienden a auto-asociarse para formar dímeros, típicamente asociados covalentemente a través de enlaces de disulfuro en la región de bisagra, y tales dímeros 25 se forman de las regiones Fc de IgG humana en las proteínas de

fusión de la presente invención. Como un resultado de la dimerización de las regiones Fc de IgG humana, los dos "grupos" de agonistas del receptor de insulina están en estrecha proximidad entre sí, y por lo tanto existen a concentración local relativamente alta. En el caso de la insulina humana, tal estrecha proximidad tendería a favorecer la auto-asociación, o dimerización, de las porciones de insulina, que afecta a la actividad de las moléculas. Un diagrama esquemático de un dímero de la proteína de fusión Fc con los grupos de porción de insulina que se han vuelto auto-asociados, o dimerizados, se proporciona en el diagrama (D) de la Figura 2. La tendencia de las moléculas de insulina a auto-asociarse también podría llevar a la auto-asociación, o dimerización, de porciones de insulina de más de un dímero de proteína de fusión Fc; un diagrama esquemático de un dímero de dos dímeros de proteína de fusión Fc con porciones de insulina auto-asociadas, o dimerizadas, se proporciona en el diagrama (E) de la Figura 2. Además, los porciones de insulina en más de dos dímeros de proteína de fusión Fc también podrían auto-asociarse de tal manera para formar, por ejemplo, un trímero comprendido de tres dímeros, o incluso agregados de orden mayor comprendidos de más de tres dímeros.

La porción de agonista del receptor de insulina de la proteína de fusión de la presente invención, sin embargo, tiene una tendencia reducida a auto-asociarse, o dimerizarse,

y por lo tanto los dímeros de proteína de fusión comprendidos de proteínas de fusión de la presente invención tienden a favorecer la estructura representada en el diagrama (C) de la Figura 2, en oposición a las estructuras representadas en los diagramas (D) y (e) de la Figura 2. Por lo tanto, mientras que la presente invención proporciona un dímero de dos proteínas de fusión, el "grupo" de agonista del receptor de insulina de cada proteína de fusión en el dímero mantiene un estado predominantemente monomérico, como se representa, por ejemplo, en el diagrama (C) de la Figura 1, y por lo tanto es más capaz de interactuar con el receptor de insulina.

En las proteínas de fusión de la presente invención, el análogo de la cadena B de insulina en el agonista del receptor de insulina incluye una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de insulina humana. En particular, para reducir la propensión de las porciones de agonista del receptor de insulina a auto-asociarse, o dimerizarse, el análogo de la cadena B de insulina incluyen una o más modificaciones de la cadena B de una molécula de insulina humana en las posiciones B₁₆, B₂₅ o B₂₇₋₃₀, que se representan en la SEC ID NO: 1 como posiciones X₄, X₅ y X₆₋₉, respectivamente. Por ejemplo: X₄ (que corresponde con B₁₆ en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede modificar a E, Q o H; X₅ (que corresponde con B₂₅ en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede modificar a H; X₆ (que corresponde

con B₂₇ en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, S, H o V; X₇ (que corresponde con B₂₈ en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, E, K, D, S o H; X₈ (que
5 corresponde con B₂₉ en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, E, P, Q, D o H; y X₉ (que corresponde con B₃₀ en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, S, E o K. Además de reducir la propensión de las porciones de agonista
10 del receptor de insulina a auto-asociarse, las modificaciones a las posiciones B₁₆ y B₂₅ en el análogo de la cadena B de insulina - X₄ y X₅ de SEC ID NO: 1, respectivamente - también se pueden hacer para ajustar la potencia, mejorar la expresión, mejorar la estabilidad química y/o física, mejorar la facilidad
15 con la cual las proteínas de fusión se pueden formular con otros excipientes comúnmente usados y/o eliminar la desamidación. El análogo de la cadena B de insulina también puede incluir modificaciones adicionales por estas razones. Haciendo referencia a las variables en la SEC ID NO: 1, tales
20 modificaciones adicionales incluyen las siguientes: modificación de X₁ (que corresponde con B₁ en la cadena B de una molécula de insulina humana) a Q o A; modificación de X₂ (que corresponde con B₂ en la cadena B de una molécula de insulina humana) a G; y/o modificación de X₃ (que corresponde con B₃ en
25 la cadena B de una molécula de insulina humana) a K, D o G.

En ciertas modalidades preferidas, el análogo de la cadena B de insulina incluye más de una modificación a la secuencia de aminoácidos de la cadena B de insulina humana en las posiciones X₄, X₅ y X₆₋₉ de la SEC ID NO: 1. En una modalidad

5 preferida, X₄ es E y X₅ es H. En ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos de X₆-X₉ de SEC ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste de: GGES, GGGS, GGDS, GGEG, GGGG, SSES, SSGS, GGEE, GGGE, GGEK, GGGK, TPGS, TGGS, HGES, GHES, GGHS, GGEH, HGGS, GHGS, GGGH, GGDD, VGES, TEET, TKPT, GGGG, TG

10 TGGG, TPGG, EPKT, TDKT, TPGS, EGGS, EGES, EEES, EPES, EPEP y GGDD. En modalidades preferidas, la secuencia de estos cuatro aminoácidos es GGGS, GGGG o TEET. En modalidades particularmente preferidas, X₄ es E, X₅ es H y X₆₋₉ es GGGG.

Cabe señalar que, mientras que X₆-X₉ de SEC ID NO: 1

15 se describen anteriormente como comprendiendo el extremo C-terminal del análogo de la cadena B de insulina (Z₁), estos aminoácidos no son críticos para la actividad de las proteínas de fusión en el receptor de insulina, y por lo tanto alternativamente se pueden considerar una extensión del primer

20 enlazante de péptido (Z₂). Por ejemplo, en el contexto de la SEC ID NO: 4, X₆-X₉ se pueden considerar ya sea parte del análogo de la cadena B de insulina o el primer enlazante de péptido en ese agonista del receptor de insulina.

En las proteínas de fusión de la presente invención,

25 el análogo de la cadena A de insulina en la porción del agonista

del receptor de insulina puede incluir una o más modificaciones a la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana destinada a mejorar la estabilidad química y física, ajustar la potencia, y/o mejorar la expresión. Haciendo referencia a
5 las variables en la SEC ID NO: 2, estas modificaciones incluyen las siguientes: modificación de X₁ (que corresponde con A₁₀ en la cadena A de una molécula de insulina humana) a T; modificación de X₂ (que se corresponde con A₁₄ en la cadena A de una molécula de insulina humana) a D, Q o E; y/o modificación
10 de X₃ (que corresponde con A₂₁ en la cadena A de una molécula de insulina humana) a G, S o A. En una modalidad preferida, X₁ es T, X₂ es D, y X₃ es G.

Además, para evitar la desamidación, así como las escisión química y/o proteolítica, si el aminoácido en la
15 posición 21 en el análogo de la cadena A de insulina en el agonista del receptor de insulina, es decir, X₃ en la SEC ID NO: 2, es una N - el aminoácido que está presente en la posición correspondiente en una molécula de insulina humana - no debe ser seguido inmediatamente en el lado C-terminal por ciertos
20 aminoácidos, tales como una G o un N, o en ciertas modalidades, un P, S, V o L. Ver, por ejemplo, Vlasak J, Ionescu R., MAb. 2011 May-Jun; 3(3): 253-63. *Fragmentation of Monoclonal Antibodies*. Cabe señalar que, mientras este requisito se cita en la primera proteína de fusión descrita anteriormente en el
25 contexto de las opciones para las posiciones X₄ y X₅ en la SEC

ID NO: 2, que pertenece al análogo de la cadena A de insulina, no es crítico para el residuo no glicina después de un residuo de asparagina en la posición 21 en el análogo de la cadena A de insulina ser considerado parte del agonista del receptor de insulina, en oposición al segundo enlazante de péptido. Por ejemplo, en el contexto de la SEC ID NO: 11, El residuo correspondiente con la posición 21 en la porción análoga de la cadena A se representa por X₁₄, y el siguiente aminoácido, X₁₅, podría ser ya sea considerado parte del agonista del receptor de insulina o el segundo enlazante de péptido.

Como se describió anteriormente, en las proteínas de fusión de la presente invención, el residuo C-terminal del análogo de la cadena B de insulina se fusiona directamente al residuo N-terminal de un primer enlazante de péptido y el residuo C-terminal del primer enlazante de péptido se fusiona directamente al residuo N-terminal del análogo de la cadena B de insulina. El primer enlazante de péptido debe proporcionar suficiente flexibilidad para que los análogos de la cadena A y cadena B de insulina logren la estructura necesaria para unirse al receptor de insulina, pero no debe ser tan larga que indebidamente interfiera con esa unión. La longitud y composición del primer enlazante de péptido se puede ajustar para ajustar la potencia y/o expresión de las proteínas de fusión. En algunas modalidades, el primer enlazante de péptido es de 5 a 10 aminoácidos de longitud, al menos 5 de los cuales

son residuos de G. En ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer enlazante de péptido se selecciona del grupo que consiste de: GGGGGG, GGGGG, EGGGGG, GEGGGG, GGEGGG, GGGEGG, GGGGEG, GGGGGE, KGGGGG, GKGGGG, GKGGG, GGGKGG, GGGGKG, GGGGGK, HGGGGG, GHGGGG, GGHGGG, GGGHGG, GGGGHG, GGGGGH, GGGGGA, GGGGGR, SGGGGG, GSGGGG, GGSGGG, GGSGGGK, GGSGGGG y GGSGGG. En ciertas modalidades preferidas, la secuencia del primer enlazante de péptido comprende la SEC ID NO: 3. Muy preferiblemente, la secuencia del primer enlazante de péptido es GGSGGGG (SEC ID NO: 15). La porción del agonista del receptor de insulina de las proteínas de fusión de la presente invención también incluye los enlaces de disulfuro encontrados en una molécula de insulina humana como se describió anteriormente, principalmente, dos enlaces de disulfuro que unen los análogos de la cadena A y cadena B de insulina en CysA7-CysB7 y CysA20-CysB19, y un enlace de disulfuro intra-cadena en el análogo de la cadena A de insulina en CysA6-CysA11.

Como se describió anteriormente, el residuo C-terminal de la porción de agonista del receptor de insulina de las proteínas de fusión de la presente invención se fusiona al residuo N-terminal de un segundo enlazante de péptido, y el residuo C-terminal del segundo enlazante de péptido se fusiona directamente al residuo N-terminal de la porción Fc. Se prefiere que el segundo enlazante de péptido sea rico en glicina, para proporcionar suficiente flexibilidad conformacional.

Preferiblemente, el segundo enlazante de péptido es de menos de 30 aminoácidos de longitud. En ciertas modalidades preferidas, el segundo enlazante de péptido está entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, con al menos 50% de los aminoácidos
 5 siendo residuos de glicina. Un segundo enlazante de péptido preferido incluye la secuencia $(GGGGX_{15})_n$ en donde X_{15} es Q, E o S y $n = 2-5$. Un segundo enlazante de péptido más preferido tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 6. Un segundo enlazante de péptido más preferido tiene la secuencia de
 10 aminoácidos
 GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEC ID NO: 7).

Como se usa en la presente, el término "región Fc de IgG humana" tiene el significado comúnmente dado al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se
 15 refiere a un fragmento de anticuerpo de IgG humana el cual se obtiene removiendo las dos regiones de unión al antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. En particular, la región Fc incluye los dominios de región constante CH2 y CH3 del anticuerpo, y también puede incluir algo o toda la región de
 20 bisagra.

Como se describió anteriormente, en ciertas modalidades de la proteína de fusión de la presente invención, la Región Fc de IgG humana comprende fragmentos de la región constante de una cadena pesada de un anticuerpo de IgG, una
 25 representación esquemática de la cual se proporciona en el

diagrama (A) de la Figura 2, y en otras modalidades, la región Fc de IgG humana comprende fragmentos de las regiones constantes de dos cadenas pesadas de un anticuerpo de IgG, una representación esquemática de la cual se proporciona en el diagrama (B) de la Figura 2. En esta modalidad, las regiones constantes de las dos cadenas pesadas se asocian entre sí a través de interacciones no covalentes y enlaces de disulfuro.

Hay cuatro subclases de IgG (G1, G2, G3, y G4) cada una de las cuales tiene diferentes estructuras y funciones biológicas conocidas como funciones efectoras. Estas funciones efectoras generalmente son mediadas a través de la interacción con el receptor Fc (FcγR) o por la unión del factor de complemento C1q. La unión a FcγR puede llevar a citólisis mediada por células dependiente del anticuerpo, mientras que la unión a factores de complemento puede llevar a la lisis celular mediada por complemento. Las estructuras y propiedades de las regiones Fc de las subclases de IgG son conocidas en la técnica. Las proteínas de fusión de la presente invención pueden contener regiones Fc de cualquiera de las subclases de IgG, aunque G2 y G4 tienen menores actividades de función efectora y unión al receptor que los anticuerpos de G1 y G3, y por lo tanto se prefieren.

Cuando se usa en la presente, el término región Fc de IgG humana también incluye versiones de tales fragmentos de anticuerpos los cuales se han modificado, alargado y/o

truncado, por ejemplo, para alterar las propiedades o características, tales como las funciones de unión al receptor de Fc y/o complemento, funciones efectoras, formación de enlaces de disulfuro, glicosilación, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), manufacturabilidad, y/o estabilidad. Por ejemplo, las regiones Fc de IgG humana de las proteínas de fusión de la presente invención se pueden modificar para reducir o remover el sitio de glicosilación N-enlazado, lo cual reducirá la afinidad de unión a Clq y citotoxicidad, y lo cual puede ayudar en la inmunogenicidad, afectar la estabilidad conformacional y velocidad de depuración in vivo, y/o modificar las funciones efectoras. Las regiones Fc de IgG humana de las proteínas de fusión de la presente invención también pueden tener algo o toda la región de bisagra removida para simplificar la dimerización de Fc mediada por disulfuro. Otros ejemplos de alteraciones incluyen fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación, metilación, acetilación, amidación, y/o modificaciones para habilitar la producción de moléculas de heterodímero. Las técnicas para modificar las estructuras y propiedades de las regiones Fc de IgG humana de las subclases de IgG son conocidas en la técnica.

Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, la región Fc de IgG humana debe servir para prolongar la vida media en plasma in vivo del agonista del

receptor de insulina. En la preparación de proteínas de fusión Fc heterólogas en donde la porción Fc se está usando por su capacidad para extender la vida media, es importante minimizar cualquier función efectora. Además, el agonista del receptor de insulina fusionado debe permanecer capaz de unirse a y activar el receptor de insulina para resultar en una disminución de niveles de glucosa en sangre y/o supresión de la producción de glucosa hepática, características las cuales se pueden analizar y medir usando técnicas conocidas, tales como las mostrada en los estudios descritos a continuación. Una vida media larga en las proteínas de fusión de la presente invención se puede demostrar usando, por ejemplo, los métodos descritos a continuación.

Una región Fc de IgG humana preferida es una región Fc de IgG4 modificada para reducir adicionalmente la función efectora, promover la formación de homodímero, y tener una porción de la bisagra suprimida, como en la SEC ID NO: 9 en donde X₁ es F; X₂ es F; X₃ es V; X₄ es V; X₅ es N; X₆ es R; y X₇ está ausente.

Otra región Fc de IgG humana preferida es una región Fc de IgG2 que tiene una porción de la bisagra suprimida, como en la SEC ID NO: 10 en donde X₁ es F; X₂ es F; X₃ es V; X₄ es V; X₅ es N; y X₆ está ausente.

Cabe señalar que, aunque las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de IgG humana preferidas citadas

anteriormente tienen porciones de las regiones de bisagra removidas para simplificar la dimerización mediada por disulfuro, aquellas regiones de bisagra pueden estar presentes en ciertas modalidades. Por ejemplo, una región Fc de IgG2 tipo

5 salvaje incluye la secuencia de seis aminoácidos ERKCCV en su extremo N-terminal, y aunque estos aminoácidos no se citan en la secuencia de región Fc de IgG2 descrita en la SEC ID NO: 10, se contempla que una región Fc de IgG humana que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID NO: 10 puede

10 comprender además algo o toda la secuencia de seis aminoácidos ERKCCV en su extremo N-terminal. De manera similar, una región Fc de IgG humana la cual comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID NO: 9 puede comprender además algunos o todos los seis aminoácidos encontrados en el extremo N-terminal

15 de una región Fc de IgG4, es decir ESKYGP. Del mismo modo, una región Fc de IgG humana la cual comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID NO: 8 puede comprender además algunos o todos los diez aminoácidos encontrados en el extremo N-terminal de una región Fc de IgG1, es decir: EPKSCDKTHT.

20 Además, la delimitación precisa entre la cual el aminoácido constituye el extremo C-terminal del segundo enlazante de péptido y cuál aminoácido constituye el extremo N-terminal de la región Fc de IgG humana no es crítica para la estructura o función de la proteína de fusión de la presente invención. Por

25 ejemplo, en el contexto de la SEC ID NO: 11, los residuos

correspondientes con las posiciones X₁₉-X₂₂ se podrían describir como el extremo C-terminal del segundo enlazante de péptido o una extensión N-terminal de la región Fc de IgG humana.

Como se describió anteriormente, la presente
5 invención también se refiere a polinucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas de fusión de la presente invención. Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión descritas anteriormente pueden estar en la forma de ARN o ADN, que incluye ADNc y ADN sintético, y que pueden ser de hebra
10 doble o hebra única. Las secuencias codificantes que codifican las proteínas de la presente invención pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético.

Los polinucleótidos que codifican para las proteínas de fusión de la presente invención pueden incluir los
15 siguientes: sólo la secuencia codificante para las proteínas, la secuencia codificante para las proteínas y secuencia codificante adicional, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia de pro-proteína; la secuencia codificante para las proteínas y secuencia no codificante, tales como intrones
20 o secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante para las proteínas. Por lo tanto, el término "polinucleótido que codifica una proteína" abarca un polinucleótido que puede incluir no sólo la secuencia para las proteínas sino también un polinucleótido que incluye secuencia codificante y/o no
25 codificante adicional.

Los polinucleótidos de la presente invención se expresarán en una célula huésped después que las secuencias se han enlazado operativamente a una secuencia de control de expresión. Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden producir fácilmente en células de mamífero tales como células CHO, NSO, HEK293, BHK, o COS; en células bacterianas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, o *Pseudomonas fluorescence*; en células de insecto, o en células fúngicas o de levadura, las cuales se cultivan usando técnicas conocidas en la técnica. Las células de insecto, y levadura u otras fúngicas, sin embargo, producen N-glicanos no humanos, de modo que las proteínas con glicosilación N-enlazada se produce en tales células pueden causar reacciones inmunogénicas si se administran a pacientes. La producción en tales células, por lo tanto, requiere la eliminación de sitios de glicosilación N-enlazados y/o ingeniería genética de las células para producir N-glicanos humanos usando técnicas conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Hamilton SR, et al., *Production of complex human glycoproteins in yeast*, 301 SCIENCE (5637): 1244-

6 (Agosto 2003). Se prefiere la producción en células de
mamífero, y la célula huésped de mamífero preferida es la línea
celular CHOK1SV que contiene un sistema de expresión de
glutamina sintetasa (GS) (ver Patente de Estados Unidos
5 5,122,464).

Los vectores que contienen las secuencias de
polinucleótidos de interés (por ejemplo, las proteínas de
fusión y secuencias de control de expresión) se pueden
transferir a la célula huésped por métodos bien conocidos, los
10 cuales varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por
ejemplo, la transformación con cloruro de calcio se usa
comúnmente para células procariotas, mientras que el
tratamiento con fosfato de calcio o electroporación se puede
usar para otros huéspedes celulares.

15 Diversos métodos de purificación de proteínas se
pueden emplear y tales métodos son conocidos en la técnica y
descritos, por ejemplo, en *Deutscher, Methods in Enzymology*
182: 83-89 (1990) y *Scopes, Protein Purification: Principles*
and Practice, 3a Edición, Springer, N.Y. (1994).

20 Como se describió anteriormente, la proteína de
fusión de la presente invención en ciertas modalidades se
produce como un dímero. En tal dímero, las regiones Fc de IgG
humana de las proteínas de fusión se asocian entre sí a través
de interacciones no covalentes y enlaces de disulfuro. Una
25 representación esquemática de tal dímero se proporciona en el

diagrama (C) de la Figura 2. Cuando las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas de fusión que integran tal dímero - por ejemplo, Proteína de Fusión A y Proteína de Fusión B en el dímero representado en el diagrama (C) de la Figura 2 - son las mismas, el dímero es referido en la presente como un "homodímero". Como se señaló anteriormente, se prefiere la expresión de proteínas de fusión de la presente invención en células de mamífero, y la expresión en tales células resulta en homodímeros. Las proteínas de fusión en tales homodímeros se asocian a través de interacciones no covalentes y enlaces de disulfuro intermoleculares en la porción Fc. Por ejemplo, la proteína producida por un gen el cual codifica la proteína de fusión de SEC ID NO: 12 sería un homodímero unido covalentemente a través de enlaces de disulfuro inter-cadena, es decir C80 a C80 y C83 a C83.

Cuando las secuencias de aminoácidos de dos proteínas de fusión que integran un dímero - por ejemplo, Proteína de Fusión A y Proteína de Fusión B en el diagrama (C) de la Figura 2 - son diferentes, el dímero es referido como un "heterodímero". Tal heterodímero se puede preparar por técnicas conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Lewis SM, et al. NAT. BIOTECHNOL. 32(2):191-8 (2014); CARTER, J. IMMUNOL. METHODS, 248 (1-2):7-15(2001); Ridgway, J.B. et al. PROTEIN ENG. 9(7):617-2 (1996).

Las referencias en la presente a composiciones

farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión incluyen composiciones farmacéuticas las cuales contienen un homodímero de esa proteína de fusión, y/o las cuales contienen un heterodímero, en donde un miembro del heterodímero es que la

5 proteína de fusión. Del mismo modo, las referencias en la presente a métodos que comprenden administrar una proteína de fusión, incluyen métodos que comprenden administrar un homodímero de esa proteína de fusión y/o administrar un heterodímero, en donde un miembro del heterodímero es esa

10 proteína de fusión. Del mismo modo, las referencias a una proteína de fusión para uso en terapia y/o una proteína de fusión para uso en la manufactura de un medicamento incluyen un homodímero de esa proteína de fusión, y/o un heterodímero en donde un miembro del heterodímero es esa proteína de fusión,

15 para uso en terapia y/o en la manufactura de un medicamento.

El término "tratamiento" o "tratar", como se usa en la presente, se refiere al manejo y cuidado de un paciente que tiene diabetes o hiperglucemia, u otra afección para la cual se indica la administración de insulina para el propósito de

20 combatir o aliviar los síntomas y complicaciones de esas condiciones. El tratamiento incluye administrar proteínas de fusión de la presente invención para prevenir o retrasar el comienzo de síntomas o complicaciones, aliviando los síntomas o complicaciones, o eliminando la enfermedad, afección, o

25 trastorno. El paciente a tratar es un mamífero, y

preferiblemente, un ser humano.

El término "prevenir" o "prevención", como se usa en la presente, se refiere a la reducción del riesgo o incidencia de, o eliminar o ralentizar la progresión de, una o más
5 afecciones, síntomas, complicaciones o trastornos.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden usar para tratar sujetos con una amplia variedad de enfermedades y afecciones. Se incluyen sujetos con hiperglucemia, diabetes insulino-dependiente así como sujetos
10 con diabetes no insulino-dependiente, incluyendo el tratamiento de sujetos no tratados previamente así como sujetos que son tratados con medicamentos orales, tales como una sulfonilurea, metformina, tiazolidindiona tales como pioglitazona, inhibidor de α -glucosidasa tal como acarbosa, y/o inyectables no
15 insulina, incluyendo terapias basadas en la incretina, tales como inhibidores de DPP-4 y agonistas de GLP-1R. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden usar para regular la glucosa en sangre en tales pacientes, y pueden tratar afecciones o complicaciones que resultan de insuficiente
20 control de la glucosa en sangre tales como retinopatía, neuropatía, o enfermedad renal.

En ciertas modalidades, la proteína de fusión de la presente invención se administra cada día, cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, una vez a la semana,
25 dos veces al mes o una vez al mes. En modalidades preferidas,

la duración de la acción es suficientemente prolongada para permitir la dosificación una vez a la semana. Incluso para tales moléculas de acción prolongada, sin embargo, se reconocerá por los expertos en la técnica que el control
5 efectivo de la glucosa también se puede proporcionar por dosis gradual acumulando un fármaco con un perfil farmacocinético largo usando un régimen de tratamiento más frecuente, tal como una vez al día. Ver, por ejemplo, Heise T and Meneghini LF, 20 ENDOCR. PRACT. p75-83 (2014).

10 En ciertas modalidades, la proteína de fusión de la presente invención se administra en combinación con un ingrediente activo adicional, tal como insulina o un análogo de la insulina, una terapia basada en la incretina, o un medicamento oral para la diabetes, tal como una sulfonilurea,
15 metformina, tiazolidindiona tal como pioglitazona o un inhibidor de α -glucosidasa tal como acarbosa.

El término "terapia basada en la incretina" incluye cualquier tratamiento el cual comprende la administración de, o promueve, permite, mejora y/o simula los efectos de, un grupo
20 de hormonas metabólicas conocidas como incretinas, el grupo incluye GLP-1 y péptido inhibidor gástrico (GIP). Las terapias basadas en la incretina las cuales están actualmente disponibles incluyen inhibidores de DPP-4 y agonistas de GLP-1R.

25 Un "inhibidor de DPP-4" es un compuesto que bloquea

la enzima DPP-4, la cual es responsable de la degradación de las incretinas. Actualmente los inhibidores de DPP-4 disponibles incluyen sitagliptina (Januvia®), y linagliptina (Tradjenta®).

5 Un "agonista de GLP-1R" se define como un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEC ID NO: 25), un análogo de GLP-1, derivado de GLP-1 o proteína de fusión GLP-1, que mantiene la actividad en el receptor de GLP-1. La actividad de GLP-1R se puede medir por
10 métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden la actividad de unión del receptor GLP-1 o activación del receptor, por ejemplo, ensayos que emplean células de islotes pancreáticos o células de insulinoma, como se describe en EP 619,322 y Patente
15 de Estados Unidos No. 5,120,712, respectivamente. Un análogo de GLP-1 es una molécula que tiene una modificación que incluye una o más sustituciones, supresiones, inversiones, o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEC ID NO: 25). Un derivado de GLP-1
20 es una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEC ID NO: 25) o de un análogo de GLP-1, pero adicionalmente tiene al menos una modificación química de uno o más de sus grupos laterales aminoácidos, átomos de carbono α , grupo amino terminal, o grupo ácido carboxílico terminal.
25 Una proteína de fusión GLP-1 es una proteína heteróloga que

comprende GLP-1, un análogo de GLP-1 o una porción de derivado de GLP-1 y un segundo polipéptido. Los agonistas de GLP-1R actualmente disponibles incluyen exenatida (Byetta® y Bydureon®), liraglutida (Victoza®), albiglutida (Tanzeum®) y
5 dulaglutida (Trulicity®), las estructuras de las cuales son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, US 5,424,286 (exenatida); US 6,268,343 (liraglutida); US 2014044717 (albiglutida); y US 7,452,966 (dulaglutida).

En modalidades en donde una proteína de fusión de la
10 presente invención se proporciona en combinación con un ingrediente activo adicional, la proteína de fusión e ingrediente activo adicional se pueden administrar simultánea, secuencialmente o en una formulación, combinada única.

Las proteínas de fusión de la presente invención son
15 efectivas en el tratamiento de tales enfermedades y afecciones administrando a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención. Como se usa en la presente, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella
20 cantidad de una proteína de fusión de la presente invención suficiente para regular la glucosa en sangre en un paciente sin causar efectos secundarios inaceptables. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión administrada a un sujeto dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y
25 de las características del sujeto, tales como salud general,

edad, sexo, peso corporal, y tolerancia a los fármacos. El experto en la materia será capaz de determinar dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. En ciertas modalidades, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención cuando se administra una vez a la semana varía desde aproximadamente 0.01 nmol/kg a aproximadamente 100 nmol/kg. Más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención cuando se administra una vez a la semana varía desde aproximadamente 1 nmol/kg a aproximadamente 50 nmol/kg. Más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención cuando se administra una vez a la semana varía desde aproximadamente 16 nmol/kg a aproximadamente 25 nmol/kg. En ciertas modalidades, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención cuando se administra una vez a la semana varía desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 200 mg. Más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención cuando se administra una vez a la semana varía desde aproximadamente 25 mg a aproximadamente 175 mg. Más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la presente invención cuando se administra una vez a la semana varía desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 160 mg.

Las personas de experiencia en la técnica entenderán que cuando la proteína de fusión de la presente invención se administra en combinación con otro ingrediente activo, tal como un agonista de GLP-1R, la dosis se puede ajustar de modo que

5 la actividad de los dos tratamientos combinados es suficiente para regular la glucosa en sangre en un paciente. Por lo tanto, la cantidad de proteína de fusión que se debe administrar para regular los niveles de glucosa en sangre en tales combinaciones puede ser menor que la que sería necesaria si la proteína de

10 fusión se administrara como monoterapia. Por ejemplo, cuando la proteína de fusión de la presente invención se proporciona en combinación con un agonista de GLP-1R, la cantidad de proteína de fusión que se proporciona en una dosis semanal se puede reducir por hasta 50%, en comparación con la cantidad de

15 la misma proteína de fusión para uso como una monoterapia, tales como las dosis descritas en el párrafo precedente.

Preferiblemente, una administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión de la presente invención en algunas modalidades proporcionará un

20 control efectivo de la glucosa mientras se reduce el riesgo de hipoglucemia y/o ganancia de peso en comparación con los tratamientos existentes. La incidencia de la hipoglucemia causada por una terapia de diabetes que agoniza el receptor de insulina se puede minimizar evitando un aumento rápido de la

25 concentración del agente terapéutico después de la

administración. Las proteínas de fusión de la presente invención tienen un perfil de acción de tiempo prolongado sin un aumento rápido en la concentración después de la administración.

5 Además, en modalidades en donde las proteínas de fusión de la presente invención se proporcionan en combinación con otro ingrediente activo, en particular, un agonista de GLP-1R, la actividad hepatopreferencial de las proteínas de fusión de la presente invención también puede reducir el riesgo de
10 hipoglucemia mientras se controla los niveles de glucosa. Debido a que la proteína de fusión de la presente invención puede acceder fácilmente al hígado a través del endotelio sinusoidal fenestrado, la molécula puede controlar la producción de glucosa hepática, con poca, si la hay, actividad
15 en la periferia, mientras el agonista de GLP-1R promueve la secreción dependiente de la glucosa de insulina endógena del páncreas que es fácilmente capaz de perfusionarse en la periferia para controlar la absorción de glucosa en el músculo y grasa.

20 Las proteínas de fusión de la presente invención se administran parenteralmente, por administración nasal o inhalación pulmonar. La administración parenteral se prefiere, y puede incluir, por ejemplo, administración sistémica, tal como por inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, o
25 intraperitoneal.

Las proteínas de fusión se pueden administrar al sujeto en una composición farmacéutica, la cual comprende una proteína de fusión de la presente invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas son típicamente, aunque no necesariamente, de naturaleza parenteral y se pueden preparar por cualquiera de una variedad de técnicas usando excipientes convencionales para productos parenterales, los cuales son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Remington: the Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21^a Edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Como se describió anteriormente, la proteína de fusión de la presente invención es un homodímero cuando se expresa en células de mamífero. Por lo tanto, cuando se usa en la presente, el término "composición que comprende una proteína de fusión" incluye una composición, la cual contiene un homodímero de una proteína de fusión. En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención incluye una composición con la proteína de fusión de la presente invención presente en una concentración de al menos 1 mg/ml, al menos 2 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 35 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 55 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 65 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml o mayor. En modalidades preferidas, la proteína de fusión está presente en una concentración de 10-100 mg/ml. En

modalidades más preferidas, la proteína de fusión está presente en una concentración de 15-75 mg/ml, y en modalidades muy preferidas, la proteína de fusión está presente en una concentración de 20-65 mg/ml.

5 El término "excipiente" significa cualquier sustancia añadida a la composición diferente de la proteína de fusión o cualesquiera otros ingredientes activos adicionales. Los ejemplos de tales excipientes que se pueden usar en las composiciones de la presente invención incluyen agentes
10 amortiguadores, agentes tensioactivos, agentes de isotonicidad y conservadores.

 En ciertas modalidades, la composición de la presente invención incluyen uno o más agentes amortiguadores para controlar el pH de la composición. Un "agente amortiguador"
15 es una sustancia la cual resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes de conjugado ácido-base. En ciertas modalidades, la composición de la presente invención tiene un pH desde aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8.0, preferiblemente, entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente
20 7.4, más preferiblemente entre aproximadamente 6.0 y 6.75. Los agentes amortiguadores adecuados para controlar el pH de las composiciones de la presente invención en el rango deseado incluyen, pero no se limitan a agentes tales como amortiguadores de fosfato, acetato, citrato, o ácidos de los mismos, arginina,
25 TRIS, e histidina, así como combinaciones de los mismos. "TRIS"

se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. La base libre y la forma clorhidrato (es decir, TRIS-HCl) son dos formas comunes de TRIS. TRIS también se conoce en la técnica como

5 trimetilol aminometano, trometamina, y tris(hidroximetil)aminometano. Los agentes amortiguadores preferidos en la composición de la presente invención son citrato, o ácido cítrico, y fosfato.

En ciertas modalidades, las composiciones de la

10 presente invención incluyen uno o más agentes de isotonicidad para minimizar el dolor tras la inyección debido a la hinchazón celular o ruptura celular. Un "agente de isotonicidad" es un compuesto que se tolera fisiológicamente e imparte una tonicidad adecuada a una formulación para impedir el flujo neto

15 de agua a través de membranas celulares que están en contacto con una composición farmacéutica administrada. Los agentes de isotonicidad conocidos incluyen glicerol, sales tales como cloruro de sodio, y monosacáridos incluyendo, pero no limitado a, manitol, dextrosa y lactosa. Los agentes de isotonicidad

20 preferidos son manitol y cloruro de sodio.

En ciertas modalidades, las composiciones de la presente invención incluyen un tensioactivo. Un "tensioactivo" es una sustancia que disminuye la tensión superficial de un líquido. Los ejemplos de tensioactivos usados en las

25 composiciones farmacéuticas y los cuales se pueden usar en

ciertas composiciones de la presente invención incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 3000, TRITON X-100), éteres de alquilo de polietilenglicol (por ejemplo, BRIJ), polipropilenglicoles, 5 copolímeros de bloque (por ejemplo, poloxámero, PLURONIC F68; poloxámero 407, PLURONIC F127; TETRONICS), ésteres de alquilo de sorbitán (por ejemplo, SPAN), aceite de ricino polietoxilado (por ejemplo, KOLLIPHOR, CREMOPHOR), y trehalosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente 10 invención también pueden contener un conservador. El término "conservador" se refiere a un compuesto añadido a una formulación farmacéutica para actuar como un agente anti-microbiano en composiciones de múltiples usos y/o titulables. Entre los conservadores conocidos en la técnica como efectivos 15 y aceptables en formulaciones parenterales están el cloruro de benzalconio, bencetonio, clorhexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metil- o propil-parabeno, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, ácido benzoico, y varias mezclas de los mismos. El conservador 20 fenólico incluye los compuestos fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparabeno, y mezclas de los mismos. Si un conservador es necesario, el conservador usado en las composiciones de la presente invención es preferiblemente un conservador fenólico, preferiblemente ya sea m-cresol o fenol.

25 Ciertos conservadores fenólicos, tales como fenol y

m-cresol, se sabe que se unen a la insulina y hexámeros de insulina y de ese modo estabilizan un cambio conformacional que aumenta la estabilidad ya sea física o química, o ambas. En composiciones que comprenden otras proteínas, sin embargo, tales conservadores pueden contribuir a la formación de agregados de proteínas, o polímeros de alto peso molecular (HMWP). Ver, por ejemplo, Maa YF and Hsu CC, Int J Pharm 140: 155-168 (1996); Fransson J, et al., Pharm. Res, 14: 606-612 (1997); Lam XM, et al., Pharm. Res., 14: 725-729 (1997); Remmele RL Jr, et al., Pharm Res 15: 200-208. (1998); Thirumangalathu R, et al., J Pharm Sci 95: 1480-1497 (2006). Tales agregados de proteínas en formulaciones terapéuticas son indeseables debido a su tendencia a inducir una respuesta inmune.

En ciertas modalidades preferidas, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la presente invención se optimiza para mejorar la estabilidad física de la proteína de fusión en las composiciones las cuales también contienen un conservador fenólico. Por ejemplo, los presentes inventores sorprendentemente descubrieron que la presencia de una mutación de aminoácido en la posición 10 en el análogo de la cadena A de insulina (variable X₁ en el análogo de la cadena A de insulina citada en la SEC ID NO: 2) reduce la acumulación de agregados de la proteína de fusión en la presencia de conservadores fenólicos, como se muestra en los estudios de estabilidad a continuación.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitantes.

5 **Expresión y Purificación de Proteínas de Fusión**

Las proteínas de fusión de la presente invención se produjeron en un sistema de expresión de células de mamífero usando la línea celular inactivada genéticamente de glutamina sintetasa (GS) (GSKO) de CHO. La inactivación genética de GS
10 habilita la rigurosidad de selección estrechada eliminando la actividad antecedente de GS endógena la cual puede permitir la supervivencia de las células bajo productivas o nada productivas bajo condiciones de selección. Los genes que codifican para proteínas de fusión se sub-clonaron en el
15 plásmido de expresión que contiene glutamina sintetasa (GS). La secuencia de ADNc que codifica las proteínas de fusión se fusionó en el armazón con la secuencia codificante de un péptido señal lo cual aumenta la secreción de la proteína de fusión en el medio de cultivo celular. La expresión se impulsó por el
20 promotor de citomegalovirus (CMV). Las células de GSKO de CHO se transfectaron de manera estable usando electroporación y la cantidad apropiada de plásmido de expresión recombinante.

Las células transfectadas se sometieron a selección en volumen en medios libres de glutamina. Los grupos
25 transfectados se colocaron en placas a baja densidad para

permitir la excrecencia de proximidad a clonal de células de expresión estables. Las células madre se seleccionaron para expresión de proteína de fusión y se escalaron en cultivos en suspensión libre de suero que se usaron para la producción.

5 Las proteínas de fusión secretadas en los medios de comunicación se purificaron por cromatografía de afinidad de Proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño siguiendo técnicas cromatográficas estándar. Brevemente, las proteínas de fusión de los medios aclarados se capturaron por
10 Mab Select Protein A (GE) que se había equilibrado con solución salina amortiguada con fosfato pH 7.4. Después de una etapa de lavado con solución salina amortiguada con fosfato pH 7.4, las proteínas de fusión unidas se eluyeron con ácido cítrico 10 mM pH 3.0. Las fracciones que contenían la proteína de fusión se
15 agruparon y se neutralizaron añadiendo 1/10 volumen de Tris 1 M pH 8.0. Los agregados solubles y multímeros se pueden remover efectivamente por técnicas comunes, incluyendo exclusión por tamaño, interacción hidrofóbica o cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones que contenían la proteína de fusión
20 monomérica (homodímero enlazado covalentemente), como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño, se agruparon, se filtraron estériles y se almacenaron.

Las secuencias de aminoácidos de proteínas de fusión ejemplares de la presente invención se muestran a continuación:

Ejemplo 1:

	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
	70	80	90	100	110	120
5	GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
	130	140	150	160	170	180
	HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG					
	190	200	210	220	230	240
	LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
10	250	260	270	280	290	
	ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					
	(SEC ID NO: 12)					

Ejemplo 2:

15	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG					
	70	80	90	100	110	120
	GSGGGGSGGGGSESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV					
	130	140	150	160	170	180
20	SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK					
	190	200	210	220	230	240
	GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ					
	250	260	270	280	290	
	PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG					
25	(SEC ID NO: 16)					

Ejemplo 3:

	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIVEQCCTSI CSLDQLENYCGGG					
	70	80	90	100	110	120
5	GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
	130	140	150	160	170	180
	DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV					
	190	200	210	220	230	240
	NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
10	250	260	270	280	290	300
	GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS					
	LG					
	(SEC ID NO: 17)					

15

Ejemplo 4:

	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIVEQCCTSI CSLDQLENYCGGGG					
	70	80	90	100	110	120
	GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE					
20	130	140	150	160	170	180
	DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
	190	200	210	220	230	240
	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN					
	250	260	270	280	290	

25

NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEC ID NO: 18)

Ejemplo 5:

5	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
	70	80	90	100	110	120
	GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
	130	140	150	160	170	180
10	DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
	190	200	210	220	230	240
	NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
	250	260	270	280	290	300
	GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS					
15	LG					

(SEC ID NO: 19)

Ejemplo 6

	10	20	30	40	50	60
20	FVGQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG					
	70	80	90	100	110	120
	GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
	130	140	150	160	170	180
	DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
25	190	200	210	220	230	240

NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

250 260 270 280 290 300

GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

LG

5 (SEC ID NO: 20)

Ejemplo 7

10 20 30 40 50 60

AGGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGSGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG

10 70 80 90 100 110 120

GQGGGGQGGGGQGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

130 140 150 160 170 180

DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP

190 200 210 220 230 240

15 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

250 260 270 280 290

NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEC ID NO: 21)

20 Ejemplo 8

10 20 30 40 50 60

FVNQHLGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG

70 80 90 100 110 120

GGQGGGGQGGGGQGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

25 70 80 90 100 110 120

HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG

70 80 90 100 110 120

LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

70 80 90 100 110 120

5 ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEC ID NO: 22)

Ejemplo 9

10 20 30 40 50 60

10 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSI CSLYQLENYCGGGG

70 80 90 100 110 120

GSGGGGSGGGGSGGGGSECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

130 140 150 160 170 180

EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

15 190 200 210 220 230 240

PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

250 260 270 280 290

NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEC ID NO: 23)

20

Ejemplo 10

10 20 30 40 50 60

FVGQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG

70 80 90 100 110 120

25

GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 130 140 150 160 170 180
 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 190 200 210 220 230 240
 5 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 250 260 270 280 290
 ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEC ID NO: 24)

10 **Actividad In Vitro**

Los lotes de prueba de los Ejemplos 1-3, 5 y 9 se prepararon en una solución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7.4) o amortiguador de citrato 10 mM (pH 6.5) y se almacenaron a 4°C. La insulina humana biosintética (Eli Lilly and Company) se preparó en HCl 0.01 N y se almacenó como
 15 alícuotas congeladas, o se preparó en una mezcla formulada que contiene m-cresol, zinc, cloruro de sodio, y amortiguador TRIS (pH 7.3) a 100 unidades/ml y se almacenó a 4°C.

Las afinidades de proteínas de fusión se determinaron
 20 en ensayos de unión al receptor realizados en membranas P1 preparadas de células 293EBNA establemente transfectadas (células de riñón embrionarias humanas 293HEK que expresan EBNA-1) sobreexpresando ya sea la isoforma A del receptor de insulina humana (hIR-A) o isoforma B del receptor de insulina
 25 humana (hIR-B) que contiene una marca de epítipo C9 en el

extremo C-terminal. Las afinidades de unión se determinaron de un ensayo de unión de radioligando competitivo realizado en (3-[¹²⁵I]-yodotirosil-A¹⁴)-insulina recombinante humana. Los valores de las muestras de prueba se calcularon como el porcentaje con relación a la actividad de insulina humana no marcada. Los valores de IC₅₀ se determinaron de análisis de regresión no lineal logística de 4 parámetros (XLFit versión 4.0, IDBS). Si es necesario, los parámetros superiores e inferiores de la curva se ajustaron a 100 o 10, respectivamente.

La constante de afinidad (K_i) se calculó del valor de IC₅₀ con base en la ecuación $K_i = IC_{50}/(1 + D/K_d)$ donde D es igual a la concentración del radioligando usado en el experimento y K_d es igual a la constante de afinidad de unión en equilibrio del radioligando por su receptor cognado determinada del análisis de unión de saturación (hIR-A = 0.205 nM; hIR-B = 0.251 nM). Los valores reportados para K_i se mostraron como media geométrica $\pm$ el error estándar de la media (SEM), con el número de determinaciones replicadas indicadas por "n" (Tabla 1).

Las proteínas de fusión ejemplificadas tienen afinidad tanto a hIR-A como hIR-B. En comparación con la insulina humana, las proteínas de fusión ejemplificadas mostraron afinidad de unión reducida a hIR-A y hIR-B (Tabla 1).

Tabla 1:

Muestra	Afinidad de Unión al Receptor, K_i, nM (SEM, n)	
	hIR-A	hIR-B
Ejemplo 1	24.9 (4.3, n=10)	26.2 (4.3, n=10)
Ejemplo 2	1.61 (0.06, n=3)	4.60 (0.86, n=3)
Ejemplo 3	10.1 (1.5, n=4)	14.5 (2.3, n=4)
Ejemplo 5	35.6 (10.4, n=4)	24.6 (3.4, n=4)
Ejemplo 9	3.74 (1.20, n=2)	4.71 (1.78, n=2)
Insulina humana	0.166 (0.008, n=10)	0.202 (0.007, n=10)

Los valores de K_i son medias geométricas. SEM es el error estándar de la media. n es el número de observaciones.

Estudios In Vivo

Estudios en el Modelo de Diabetes en Ratas Tratadas con Estreptozotocina (STZ)

Los efectos de las Proteínas de Fusión se investigaron en el modelo de diabetes en ratas tratadas con STZ. Ratas Sprague-Dawley machos, 400-425 gramos de peso corporal, se anestesiaron con isoflurano y se les administró una inyección única de Zanosar® (STZ artículo #89256, Teva Parenteral Medicines, 40 mg/kg IV). Las ratas se usaron en los estudios 3 días después de la inyección de Zanosar®; sólo los animales con glucosa en sangre no en ayunas entre 400-550 mg/dL se usaron en estos estudios.

Las ratas se distribuyeron en grupos para proporcionar varianza comparable en glucosa en sangre y peso corporal y luego se aleatorizaron. La glucosa en sangre se midió usando el glucómetro Accucheck Aviva (Roche). Las ratas
5 tratadas con STZ se administraron con una inyección subcutánea (SC) única de dosis de 30 nmol/kg.

Las muestras de sangre para las mediciones de glucosa se recolectaron por sangrado de la cola. Los animales tuvieron libre acceso al alimento y agua durante todo el experimento.
10 Los datos de glucosa en sangre se proporcionaron en la Figura 1. Los datos mostrados en la Figura 1 son la media $\pm$ SEM ($n = 6$ para los Ejemplos 1 y 8; $n = 3$ para los ejemplos restantes). Se recolectaron los datos de glucosa en sangre para puntos de tiempo durante el período de alimentación inicial (entre 0 y
15 24 horas), pero no se incluyeron en la Figura 1 para facilidad de la representación visual. Como se muestra en la Figura 1, cada uno de los Ejemplos 1-10 proporciona una disminución de la glucosa durante un período de tiempo prolongado.

Las propiedades farmacocinéticas de los Ejemplos 1,
20 3-6 y 9-10 también se caracterizaron después de la dosificación subcutánea (SC) en ratas tratadas con STZ como se describió anteriormente. Los datos se generaron usando un ensayo ELISA de receptor de insulina que requiere la presencia de insulina que sea capaz de unirse al receptor de insulina. El ELISA de
25 receptor de insulina utilizó el receptor de insulina humana

(R&D Systems #1544-IR/CF aa28-944) como captura. El receptor de insulina humana se unió a una placa Immunlon 4 HBX por anticuerpo HisTag anti-6x de ratón (Novagen 70796). La curva de estándar de proteína de fusión y las muestras se diluyeron en 100% de plasma de EDTA K3 de rata y se detectaron por peroxidasa de rábano picante de Fc de IgG anti-humana de ratón (SouthernBiotech 9040-05). Las concentraciones de los Ejemplos 3-6 y 9-10 en un punto de tiempo de 36 horas están todas entre 22.1 ± 9.8 mg/mL y 1498 ± 690 mg/mL. La Tabla 3 muestra las concentraciones del Ejemplo 1 con el tiempo, y la Tabla 4 muestra los parámetros farmacocinéticos después del análisis no compartimental de los datos del Ejemplo 1. Los datos apoyan una duración extendida de la biodisponibilidad de las proteínas de fusión de la presente invención.

Tabla 3

Tiempo (horas)	Concentración (mg/ml)
1	335 ± 104
6	3559 ± 447
12	5991 ± 1578
24	10614 ± 1334
48	12629 ± 1811
96	8766 ± 2028
168	5017 ± 253

240	3682 ± 509
336	2.014 ± 134

Los datos representan la media y desviación estándar de $n = 3$.

5

Tabla 4

Parámetro PK	Resultado
AUC _{0-∞} (µg*h/mL)	1066 ± 363
C _{max} (µg/mL)	6.81 ± 1.62
T _{max} (hr)	40 ± 14
CL o CL/F (mL/hr/kg)	2.15 ± 0.91
t _{1/2} (hr)	82 ± 12
%F	147

10

15

Los datos representan la media y desviación estándar de $n = 3$.

Abreviaturas: AUC_{0-∞} - área bajo la curva desde 0 a infinito,

C_{max} - concentración máxima, T_{max} - tiempo a la máxima concentración, CL - depuración, F - biodisponibilidad, t_{1/2} -

20

vida media.

Estudio de Fijación Euglucémica en Ratas Normales

Un estudio de fijación euglucémica en ratas Sprague-Dawley machos se realizó para entender en general la actividad

25

in vivo del Ejemplo 1 sobre la utilización de la glucosa y

determinar la actividad del Ejemplo 1 en el hígado vs tejidos periféricos. Un bolo/infusión continua de 3-³H-glucosa se inició en ratas en ayunas durante la noche crónicamente cateterizadas para determinar la producción endógena de glucosa (EGP) bajo condiciones basales. Un bolo/infusión intravenosa continua del artículo de prueba - 7 nmol/kg [bolo] y 1 nmol/kg/hr [velocidad continua] - o comparador de insulina lispro - [no bolo] y 0.75 mU/kg/min [velocidad continua] - luego se administró y una infusión intravenosa variable de 20% de glucosa se inició y se ajustó periódicamente para mantener la concentración de glucosa en sangre a 100-110 mg/dL. Las velocidades del bolo/infusión se seleccionaron para lograr velocidades de infusión de glucosa comparables (GIR) y supresión comparable de EGP bajo condiciones de fijación euglucémica en cada grupo. La somatostatina se administró para inhibir la secreción de insulina endógena. Las muestras de sangre arterial se obtuvieron durante el experimento para monitorear los hematocritos, insulina en plasma, y ácidos grasos libres, péptido C, y EGP basal y de fijación. Al final del experimento, la 2-[1-¹⁴C]-desoxiglucosa se administró para medir la absorción de glucosa en tejido bajo concentraciones de glucosa en estado estable. Bajo estas condiciones coincidentes, la actividad periférica del artículo de prueba y comparadores se analizó como la absorción de glucosa en el músculo sóleo y supresión de ácidos grasos libres en plasma

(FFA). Todos los datos se analizaron usando un Análisis de Varianza de una vía con prueba post-hoc de Dunnett usando el grupo de insulina lispro como el comparador de control.

Las dosis de bolo e infusión del Ejemplo 1 resultó
5 en una concentración en plasma estable de 274 ± 57 nM durante el transcurso del experimento de fijación. Como se muestra en la Tabla 5, ambos grupos de animales lograron GIR comparable durante la fase de fijación del experimento. La glucosa en sangre promedio en el grupo del Ejemplo 1 es ligeramente mayor
10 que el grupo de insulina lispro. Ambos grupos tuvieron velocidades de EGP basales y de fijación similares (Tabla 5). Además, el porcentaje de cambio de EGP basal en el grupo del Ejemplo 1 es comparable con el grupo de control de insulina lispro (Tabla 5). Para evaluar la actividad periférica bajo
15 condiciones equivalentemente en fijación, la supresión de FFA en plasma y absorción de glucosa en músculo se midieron. Mientras que la insulina lispro resultó en una reducción de los niveles de FFA en plasma durante el curso del experimento de fijación, el Ejemplo 1 no lo hizo. (Tabla 5). Además, la
20 infusión del Ejemplo 1 resultó en una disminución de 33% en la absorción en el músculo sóleo en comparación con la insulina lispro. (Tabla 5). Colectivamente, estos datos indicaron que el Ejemplo 1 exhibe actividad periférica reducida en comparación con la insulina lispro.

Tabla 5:

5

		Insulina lispro	Ejemplo 1
Glucosa en sangre (mg/dL)		106.3 ± 2.2	111.8 ± 1.2*
GIR (mg/kg/min)		4.71 ± 0.46	4.72 ± 0.13
Velocidad de EGP (mg/kg/min)	Basal	5.062 ± 0.141	5.004 ± 0.093
	Fijación	3.607 ± 0.241	3.509 ± 0.160
% de cambio de EGP basal		-29.3 ± 3.5	-30.1 ± 2.5
% de Supresión de FFA en plasma de basal		-14.5 ± 4.1	9.9 ± 2.4*
Rg (μmol/100 mg/min)		11.34 ± 1.73	7.66 ± 1.38

Los valores se muestran como media ± SEM de 13
 10 animales para insulina lispro y 17 animales para el Ejemplo 1.
 Rg = índice metabólico de la glucosa. El análisis estadístico
 se completó por ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc
 de Dunnett. * = Significativamente diferente de la insulina
 lispro (p < 0.05).

15

Eficacia In vivo en Monos Cynomolgus

Los parámetros farmacocinéticos (PK) del Ejemplo 1 se
 evaluaron después de una dosis intravenosa única de 1.5 nmol/kg
 y una dosis subcutánea única de 3 nmol/kg en monos cynomolgus.
 20 Las muestras de plasma para el análisis PK se recolectaron de
 tres animales por grupo/ruta, durante el transcurso de 3
 semanas. Se utilizaron dos ensayos para el análisis PK: ELISA
 de receptor de insulina y ELISA de Fc de IgG total. El ELISA
 de receptor de insulina utilizó el receptor de insulina humana
 25 (R&D Systems 1544-IR/CF) como captura. El receptor de insulina

humana se unió a una placa Immulon 4 HBX por anticuerpo anti-HisTag de ratón (Novagen 70796). La curva de estándar del Ejemplo 1 y las muestras se diluyeron en 100% de plasma de monos cynomolgus (el anticoagulante fue K3 EDTA) y se detectó por peroxidasa de rábano picante de Fc de IgG anti-humana de ratón (SouthernBiotech 9040-05). El ELISA de IgG total utilizó la IgG₂ anti-humana (Abcam ab1933) como el reactivo de captura. El Ejemplo 1 se diluyó en 100% de plasma de monos cynomolgus y el anticuerpo de detección fue el mismo como en el ELISA de receptor de insulina. Los resultados de ambos ensayos se muestran en la Tabla 6, y los parámetros PK asociados se muestran en la Tabla 7. El Ejemplo 1 mostró biodisponibilidad completa en monos, y el ensayo de insulina activa y el ensayo de Fc total produjo resultados similares.

15

Tabla 6. PK del Ejemplo 1 en Monos Cynomolgus Normales.

20

Tiempo (horas)	Concentración $\pm$ SD (ng/ml)			
	ELISA de Receptor de Insulina		ELISA de Fc Total	
	IV	SC	IV	SC
	1.5 nmol/kg	3.0 nmol/kg	1.5 nmol/kg	3.0 nmol/kg
0.083	1213 $\pm$ 212	NA	2190 $\pm$ 1369	NA
1	1172 $\pm$ 182	<43.75 $\pm$ NC	1708 $\pm$ 1219	<43.75 $\pm$ NC
3	863 $\pm$ 114	87 $\pm$ 25	798 $\pm$ NC	92 $\pm$ 22
6	726 $\pm$ 119	272 $\pm$ 31	688 $\pm$ 96	209 $\pm$ 116

25

5	12	576 ± 88	579 ± 78	457 ± 178	409 ± 145
	24	422 ± 67	788 ± 69	332 ± 95	685 ± 359
	48	299 ± 39	805 ± 55	260 ± 19	802 ± 64
	72	219 ± 42	651 ± 83	199 ± 34	770 ± 83
	96	173 ± 26	544 ± 89	159 ± 25	703 ± 390
10	120	146 ± 28	452 ± 55	152 ± 27	574 ± 160
	168	83 ± 13	289 ± 54	126 ± NC	395 ± 70
	216	48 ± NC	183 ± 44	99 ± NC	208 ± 123
	240	<43.75 ± NC	145 ± 25	80 ± NC	242 ± NC
	336	<43.75 ± NC	63 ± NC	47 ± NC	NC
	504	<43.75 ± NC	<43.75 ± NC	<43.75 ± NC	<43.75 ± NC

Los datos representan la media y desviación estándar de n = 3.

Abreviaturas: IV = intravenosa; SD = desviación estándar; NC = no calculado

15

Tabla 7. Parámetros PK derivados de Análisis No Compartmental de Datos en la Tabla 6.

	ELISA de Receptor de Insulina		ELISA de Fc Total	
	IV	SC	IV	SC
Dosis (nmol/kg)	1.5	3.0	1.5	3.0
AUC _{0-inf} (µg*hr/mL)	51.1 ± 6.4	127 ± 7	62.7 ± 5.8	171 ± 17
C _{max} (µg/mL)	1.22 ± 0.22	0.82 ± 0.06	2.24 ± 1.38	0.90 ± 0.21
T _{max} (hr)	0	48 ± 24	0	64 ± 28
CL o CL/F (mL/hr/kg)	1.99 ± 0.24	1.59 ± 0.09	1.61 ± 0.15	1.19 ± 0.11
T _{1/2} (hr)	61 ± 9	70 ± 2	127 ± 18	148 ± 53
V _{ss} (mL/kg)	164 ± 31	NA	256 ± 47	NA
%F	NA	125	NA	136

Los datos representan la media y desviación estándar de $n = 3$.
Abreviaturas: AUC_{0-inf} - área bajo la curva desde 0 a infinito,
 C_{max} - concentración máxima (para administración IV la C_{max} se
extrapola en el tiempo 0), T_{max} - tiempo a la máxima
5 concentración, CL - depuración, F - biodisponibilidad, $t_{1/2}$ -
vida media, V_{ss} - volumen en estado estable de distribución, NA
- no aplicable.

Estabilidad

10 **Formulación a 65 mg/mL No Conservada del Ejemplo 1**

El Ejemplo 1 se formuló a 65 mg/ml en citrato 10 mM,
46.4 mg/mL de manitol, 0.02% de polisorbato 80, pH 6.5 y se
almacenó a 30°C. Las muestras se analizaron para el porcentaje
de alto peso molecular por cromatografía de exclusión por tamaño
15 (SEC) a 0, 2, y 4 semanas inyectando 1 μ L de los 65 mg/mL de
muestra. La SEC analítica se realizó en un sistema Agilent 1100
equipado con una columna TSKgel SuperSW3000 (Tosoh Bioscience)
y fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, fase móvil de pH 7.0 que
fluye a 0.4 mL/min durante 15 minutos. Los picos se detectaron
20 a una absorbancia de 280 nm y los cromatogramas se analizaron
usando el software ChemStation. El porcentaje de alto peso
molecular en el tiempo cero es 1.13%, en el tiempo de dos
semanas es 1.68%, y en el tiempo de cuatro semanas es 1.74%.
Estos resultados apoyan la estabilidad del Ejemplo 1 a
25 concentración de 65 mg/mL con crecimiento mínimo de agregado

soluble después de 4 semanas a 30°C.

**Formulaciones a 1 mg/mL Conservadas y No Conservadas
de los Ejemplos 1 y 3**

5 Los Ejemplos 1 y 3 se formularon a 1 mg/mL en citrato
10 mM, pH 6.5 en la presencia o ausencia de m-Cresol 30 mM y
se almacenaron a 30°C. Las muestras se analizaron para el
porcentaje de alto peso molecular por cromatografía de
exclusión por tamaño (SEC) en tiempo cero y 2 semanas inyectando
10 10 µL de 1 mg/mL de muestra. La SEC analítica se realizó en un
sistema Agilent 1100 equipado con una columna TSKgel G3000SWXL
(Tosoh Bioscience) y PBS + NaCl 350 mM, fase móvil de pH 7.4
que fluye a 0.5 mL/min durante 35 minutos o 45 minutos para las
muestras en la ausencia o presencia de m-cresol,
15 respectivamente. Los picos se detectaron a una absorbancia de
214 nm y los cromatogramas se analizaron usando el software
ChemStation. Para el Ejemplo 3, sin y con m-cresol, el
porcentaje de alto peso molecular en el tiempo cero fue 0.2% y
3.06%, respectivamente. El porcentaje de alto peso molecular a
20 las 2 semanas sin y con m-cresol fue 0.2% y 1.73%,
respectivamente. Estos resultados muestran un aumento inmediato
de agregado soluble después de la adición de m-cresol para el
Ejemplo 3 en el tiempo cero. Para el Ejemplo 1, en la ausencia
y presencia de m-cresol, el porcentaje de alto peso molecular
25 en el tiempo cero fue 0.16% y 0.15%, respectivamente. El

porcentaje de alto peso molecular a las 2 semanas en la ausencia y presencia de m-cresol fue 0.18% y 0.31%, respectivamente. Estos resultados demuestran la estabilidad, en la presencia de conservador, del Ejemplo 1, que incluye la modificación del aminoácido en la posición 10 en el análogo de la cadena A de insulina (variable X₁ en la SEC ID NO: 2, Z₃ en la primera proteína de fusión descrita anteriormente) a un residuo T, con relación al Ejemplo 3, que incluye el residuo I nativo en esa posición, pero que de otro modo comprende la misma secuencia de aminoácidos del agonista del receptor de insulina como en el Ejemplo 1.

Secuencias

SEC ID NO: 1 - Análogo de la cadena B de insulina

X₁X₂X₃QHLCSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉

en donde X₁ es F, Q o A; X₂ es V o G; X₃ es N, K, D, G, Q, A o E; X₄ es E, Y, Q, o H; X₅ es H o F; X₆ es G, T, S, H, V o está ausente; X₇ es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X₈ es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X₉ es G, T, S, E, K, A o está ausente, siempre que el análogo de la cadena B de insulina incluya al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de una molécula de insulina humana en X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, o X₉

SEC ID NO: 2 - Análogo de la cadena A de insulina

GIVEQCCTSX₁CSLX₂QLENYCX₃X₄

X_1 es T o I; X_2 es D, Y, Q o E; X_3 es G, N, S o A; y X_4 es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que si X_3 es N, entonces X_4 debe ser un aminoácido diferente de G o N

5

SEC ID NO: 3 - Primer enlazante de péptido

X_1GX_2GGGG , en donde X_1 es G o está ausente; y X_2 es G, S o está ausente

10 **SEC ID NO: 4 - Agonista del receptor de insulina**

$X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9X_{10}GX_{11}GGGGGIVEQCCTSX_{12}CSLX_{13}QLENYCX_{14}X_{15}$

en donde X_1 es F, Q o A; X_2 es V o G; X_3 es N, K, D, G, Q, A o E; X_4 es E, Y, Q, o H; X_5 es H o F; X_6 es G, T, S, H, V o está ausente; X_7 es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X_8 es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X_9 es G, T, S, E, K, A o está ausente; X_{10} es G o está ausente; X_{11} es G, S o está ausente; X_{12} es T o I; X_{13} es D, Y, Q o E; X_{14} es G, N, S o A; y X_{15} es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que al menos uno de X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , o X_9 deba ser un aminoácido diferente que el encontrado, respectivamente, en la posición B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ o B₃₀ de la cadena B de una molécula de insulina humana, y además siempre que si X_{14} es N, entonces X_{15} debe ser un aminoácido diferente de G o N

25

SEC ID NO: 5 - Agonista del receptor de insulina

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG

SEC ID NO: 6 - Segundo enlazante de péptido5 GGGGX₁GGGGX₂GGGGX₃GGGGX₄X₅X₆

en donde X₁ es Q o E; X₂ es Q o E; X₃ es Q o E; X₄ es G, E, Q o
 está ausente; X₅ es G o está ausente; y X₆ es G o está ausente

SEC ID NO: 7 - Segundo enlazante de péptido

10 GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG

SEC ID NO: 8 - Región Fc de IgG humana

CPPCPAPELLGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 15 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX₆

en donde X₁ es F, Q o E; X₂ es F, Q o E; X₃ es V o T; X₄ es V o
 T; X₅ es N, D o Q; y
 X₆ es K o está ausente

20

SEC ID NO: 9 - Región Fc de IgG humana

PCPPCPAPEAAGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSQEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQFX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 25 LYSX₆LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGX₇

en donde X_1 es F, Q o E; X_2 F, Q o E; X_3 es V o T; X_4 es V o T; X_5 es N, D o Q; X_6 es R, o K; X_7 es K o está ausente

SEC ID NO: 10 - Región Fc de IgG humana

5 ECPPCPAPPVAGPSV X_1 L X_2 PPKPKDTLMISRTPEVTC X_3 V X_4 DVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFX $_5$ STFRVVS V_{LT} VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNV F_{SC} SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX $_6$

en donde X_1 es F, Q o E; X_2 es F, Q o E; X_3 es V o T; X_4 es V o
10 T; X_5 es N, D o Q; y X_6 es K o está ausente

SEC ID NO: 11 - Proteína de fusión

X_1 X_2 X_3 QHL C_{GSH} LVEAL X_4 L V_{CGER} GFX $_5$ Y X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} G X_{11} GGGGGIVEQCCT $S_{X_{12}}$ CSL X_{13}
 Q_{LENY} C X_{14} X_{15} GGGG X_{16} GGGG X_{17} GGGG X_{18} GGGG X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} CPPCPAP X_{23} X_{24} AG X_{25} PS
15 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV $S_{X_{26}}$ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 X_{27} RVVSV $L_{TVX_{28}}$ HQDWLNGKEYKCKVSNKGLP X_{29} X_{30} IEKTISK X_{31} KGQPREPQVYTLPPS
 X_{32} EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP X_{33} LDSDGSFFLY $S_{X_{34}}$ LT
VDKSRWQ X_{35} GNV F_{SC} SVMHEALHNHYTQKSLSLS X_{36} G

en donde X_1 es F, Q o A; X_2 es V o G; X_3 es N, K, D, G, Q, A o
20 E; X_4 es E, Y, Q, o H; X_5 es H o F; X_6 es G, T, S, H, V o está
ausente; X_7 es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X_8 es G, E,
K, P, Q, D, H o está ausente; X_9 es G, T, S, E, K, A o está
ausente, siempre que al menos uno de X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , o X_9 sea
un aminoácido diferente del que está presente, respectivamente,
25 en la posición B_{16} , B_{25} , B_{27} , B_{28} , B_{29} o B_{30} de una cadena B de

insulina humana; X₁₀ es G o está ausente; X₁₁ es G, S o está
 ausente; X₁₂ es T o I; X₁₃ es D, Y, Q o E; X₁₄ es G, N, S o A;
 X₁₅ es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente,
 siempre que si X₁₄ es N, entonces X₁₅ debe ser un aminoácido
 5 diferente de G o N; X₁₆ es Q o E; X₁₇ es Q o E; X₁₈ es Q o E; X₁₉
 es G, E, Q o está ausente; X₂₀ es G o está ausente; X₂₁ es G o
 está ausente; X₂₂ es E o P; X₂₃ es E o P; X₂₄ es A o V; X₂₅ es G
 o está ausente; X₂₆ es Q o H; X₂₇ es Y o F; X₂₈ es L o V; X₂₉ es
 S o A; X₃₀ es S o P; X₃₁ es A o T; X₃₂ es Q o R; X₃₃ es V o M; X₃₄
 10 es R o K; X₃₅ es E o Q; y X₃₆ es L o P.

SEC ID NO: 12 - Proteína de fusión

	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
15	70	80	90	100	110	120
	GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
	130	140	150	160	170	180
	HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG					
	190	200	210	220	230	240
20	LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
	250	260	270	280	290	
	ENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

SEC ID NO: 13 - Cadena A de insulina humana

25 GIVEQCCTSIKSLYQLENYCN

SEC ID NO: 14 - Cadena B de insulina humana

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

SEC ID NO: 15 - Primer enlazante de péptido

5 GGSGGGG

SEC ID NO: 16 - Proteína de fusión

	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG					
10	70	80	90	100	110	120
	GSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV					
	130	140	150	160	170	180
	SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK					
	190	200	210	220	230	240
15	GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ					
	250	260	270	280	290	
	PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG					

SEC ID NO: 17 - Proteína de fusión

20	10	20	30	40	50	60
	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG					
	70	80	90	100	110	120
	GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
25	130	140	150	160	170	180

DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

190 200 210 220 230 240

NKGLPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

250 260 270 280 290 300

5 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LG

SEC ID NO: 18 - Proteína de fusión

10 20 30 40 50 60

10 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSI

70 80 90 100 110 120

GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

130 140 150 160 170 180

DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS

15 190 200 210 220 230 240

APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

250 260 270 280 290

NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20 **SEC ID NO: 19 - Proteína de fusión**

10 20 30 40 50 60

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG

70 80 90 100 110 120

GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

130 140 150 160 170 180
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 190 200 210 220 230 240
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 5 250 260 270 280 290 300
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS
 LG

SEC ID NO: 20 - Proteína de fusión

10 10 20 30 40 50 60
 FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSI CSLDQLENYCGGG
 70 80 90 100 110 120
 GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 130 140 150 160 170 180
 15 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 190 200 210 220 230 240
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 250 260 270 280 290 300
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS
 20 LG

SEC ID NO: 21 - Proteína de fusión

10 20 30 40 50 60
 AGGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSI CSLDQLENYCGGGG
 25 70 80 90 100 110 120

GQGGGGQGGGGQGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
 130 140 150 160 170 180
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 190 200 210 220 230 240
 5 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 250 260 270 280 290
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEC ID NO: 22 - Proteína de fusión

10 10 20 30 40 50 60
 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYTPKTGGSGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
 70 80 90 100 110 120
 GQGGGGQGGGGQGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 130 140 150 160 170 180
 15 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 190 200 210 220 230 240
 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 250 260 270 280 290
 ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

SEC ID NO: 23 - Proteína de fusión

10 20 30 40 50 60
 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG
 70 80 90 100 110 120
 25 GSGGGGSGGGGSGGGGSECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

130 140 150 160 170 180
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
190 200 210 220 230 240
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
5 250 260 270 280 290
NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEC ID NO: 24 - Proteína de fusión

10 10 20 30 40 50 60
FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
70 80 90 100 110 120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
130 140 150 160 170 180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
15 190 200 210 220 230 240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
250 260 270 280 290
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20 **SEC ID NO: 25 - GLP-1**

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG