

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                    |                                                                                                  |                                                                               |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>X20356    | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                               |
| International application No.<br>PCT/US2016/029807 | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br>28 April 2016 (28-04-2016)                | (Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> )<br>7 May 2015 (07-05-2015) |
| Applicant<br><br>ELI LILLY AND COMPANY             |                                                                                                  |                                                                               |

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

This international search report consists of a total of 4 sheets.

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

## 1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

4. With regard to the **title**,

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

5. With regard to the **abstract**,

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

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1  
☒ as suggested by the applicant  
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention  
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/029807

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2016/029807

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/62 A61K38/28 C12N15/62  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | CN 103 509 118 A (GUO HUAIZU)<br>15 January 2014 (2014-01-15)<br>cited in the application<br>the whole document<br>-----                                | 1-37                  |
| Y         | KR 101 324 828 B1 (X)<br>1 November 2013 (2013-11-01)<br>cited in the application<br>the whole document<br>-----                                        | 1-37                  |
| Y         | WO 2005/000892 A2 (LILLY CO ELI [US];<br>GLAESNER WOLFGANG [US]; MILLICAN ROHN LEE<br>JR [US];) 6 January 2005 (2005-01-06)<br>page 1 - page 9<br>----- | 1-37                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 2016

Date of mailing of the international search report

28/06/2016

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Mabit, Hélène

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/029807

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date     |
|-------------------------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------|
| CN 103509118                              | A                   | 15-01-2014                  | NONE                    |
| KR 101324828                              | B1                  | 01-11-2013                  | NONE                    |
| WO 2005000892                             | A2                  | 06-01-2005                  | AR 044776 A1 05-10-2005 |
|                                           |                     | AT 525395 T 15-10-2011      |                         |
|                                           |                     | AU 2004251145 A1 06-01-2005 |                         |
|                                           |                     | BR PI0411132 A 18-07-2006   |                         |
|                                           |                     | CA 2528591 A1 06-01-2005    |                         |
|                                           |                     | CN 1802386 A 12-07-2006     |                         |
|                                           |                     | CN 101974090 A 16-02-2011   |                         |
|                                           |                     | CY 1111991 T1 04-11-2015    |                         |
|                                           |                     | DK 1641823 T3 12-12-2011    |                         |
|                                           |                     | EP 1641823 A2 05-04-2006    |                         |
|                                           |                     | EP 2368909 A1 28-09-2011    |                         |
|                                           |                     | ES 2371072 T3 27-12-2011    |                         |
|                                           |                     | HK 1149566 A1 08-04-2016    |                         |
|                                           |                     | HR P20110714 T1 30-11-2011  |                         |
|                                           |                     | IL 171926 A 30-12-2010      |                         |
|                                           |                     | JP 4629047 B2 09-02-2011    |                         |
|                                           |                     | JP 2007536902 A 20-12-2007  |                         |
|                                           |                     | KR 20060022262 A 09-03-2006 |                         |
|                                           |                     | MX PA05013565 A 09-03-2006  |                         |
|                                           |                     | NZ 543292 A 30-04-2008      |                         |
|                                           |                     | PL 1641823 T3 29-02-2012    |                         |
|                                           |                     | PT 1641823 E 08-11-2011     |                         |
|                                           |                     | SI 1641823 T1 30-12-2011    |                         |
|                                           |                     | UA 87458 C2 27-07-2009      |                         |
|                                           |                     | US 2007036806 A1 15-02-2007 |                         |
|                                           |                     | US 2009074769 A1 19-03-2009 |                         |
|                                           |                     | WO 2005000892 A2 06-01-2005 |                         |

## 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  $\epsilon$ -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  $\epsilon$ -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  $\gamma$ -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; X<sub>4</sub> es E, Y, Q, o H; X<sub>5</sub> es H o F; X<sub>6</sub> es G, T, S, H, V o está ausente; X<sub>7</sub> es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X<sub>8</sub> es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X<sub>9</sub> 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 X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> (SEC ID NO: 1);

ii) Z<sub>2</sub> 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) Z<sub>3</sub> es un análogo de la cadena A de insulinaque comprende la secuencia de aminoácidos:

15 GIVEQCCTSX<sub>1</sub>CSLX<sub>2</sub>QLENYCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

X<sub>1</sub> es T o I; X<sub>2</sub> es D, Y, Q o E; X<sub>3</sub> es G, N, S o A; y X<sub>4</sub> es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que si X<sub>3</sub> es N, entonces X<sub>4</sub> 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 X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, y X<sub>9</sub> 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: X<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena A de  
5 insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde X<sub>3</sub> es N y en donde X<sub>4</sub> 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 X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>,

y X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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 X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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 X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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: X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es N o D; X<sub>4</sub> es E; X<sub>5</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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 X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, y X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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: X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es N o D; X<sub>4</sub> es E; X<sub>5</sub> es H; y X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> 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 X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, y X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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 X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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 X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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: X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es N o D; X<sub>4</sub> es E; X<sub>5</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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 X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, y X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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: X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es N o D; X<sub>4</sub> es E; X<sub>5</sub> es H; y X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> como X<sub>2</sub> 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 X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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: X<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> 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: X<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> 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 X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, y X<sub>9</sub> 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<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> 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 X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> son cada uno G, en donde: X<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> 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 X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> 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<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> está ausente.

En ciertas modalidades, el análogo de la cadena B de insulina comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde: X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es N o D; X<sub>4</sub> es E; X<sub>5</sub> es H; y el análogo de la cadena A de insulina tiene la secuencia de SEC ID NO: 2, en donde: X<sub>1</sub> es I o T; X<sub>2</sub> es D; X<sub>3</sub> es G; y X<sub>4</sub> 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:

GGGGX<sub>1</sub>GGGGX<sub>2</sub>GGGGX<sub>3</sub>GGGGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>

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:

CPPCPAPELLGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
20 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

en donde X<sub>1</sub> es F, Q o E; X<sub>2</sub> es F, Q o E; X<sub>3</sub> es V o T; X<sub>4</sub> es V o  
T; X<sub>5</sub> es N, D o Q; y

X<sub>6</sub> 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   PCPPCPAPEAAGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSQEDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
LYSX<sub>6</sub>LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGX<sub>7</sub>

en donde X<sub>1</sub> es F, Q o E; X<sub>2</sub> F, Q o E; X<sub>3</sub> es V o T; X<sub>4</sub> es V o T;  
15   X<sub>5</sub> es N, D o Q; X<sub>6</sub> es R, o K; X<sub>7</sub> 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 X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es F; X<sub>3</sub> es V; X<sub>4</sub> es V; X<sub>5</sub> es N; X<sub>6</sub> es R; y X<sub>7</sub> 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:

ECPPCPAPPVAGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE  
5 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

en donde X<sub>1</sub> es F, Q o E; X<sub>2</sub> es F, Q o E; X<sub>3</sub> es V o T; X<sub>4</sub> es V o T; X<sub>5</sub> es N, D o Q; y X<sub>6</sub> 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 X<sub>1</sub> es F; X<sub>2</sub> es F; X<sub>3</sub> es V; X<sub>4</sub> es V; X<sub>5</sub> es N; y X<sub>6</sub> está ausente.

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

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GX<sub>11</sub>GGGGGIVEQCCTSX<sub>12</sub>CSLX<sub>1</sub>  
20 3QLENYCX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GGGGX<sub>16</sub>GGGGX<sub>17</sub>GGGGX<sub>18</sub>GGGGX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>CPPCPAPX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>AGX<sub>25</sub>PS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSX<sub>26</sub>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
X<sub>27</sub>RVVSVLTVX<sub>28</sub>HQDWLNGKEYKCKVSNKGLP<sub>29</sub>X<sub>30</sub>IEKTISKX<sub>31</sub>KGQPREPQVYTLPPS  
X<sub>32</sub>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX<sub>33</sub>LDSDGSFFLYSX<sub>34</sub>LT  
VDKSRWQX<sub>35</sub>GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSX<sub>36</sub>G

25 en donde X<sub>1</sub> es F, Q o A; X<sub>2</sub> es V o G; X<sub>3</sub> es N, K, D, G, Q, A o

E; X<sub>4</sub> es E, Y, Q, o H; X<sub>5</sub> es H o F; X<sub>6</sub> es G, T, S, H, V o está ausente; X<sub>7</sub> es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X<sub>8</sub> es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X<sub>9</sub> es G, T, S, E, K, A o está ausente, siempre que al menos uno de X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub> sea un aminoácido diferente del que está presente, respectivamente, en la posición B<sub>16</sub>, B<sub>25</sub>, B<sub>27</sub>, B<sub>28</sub>, B<sub>29</sub> o B<sub>30</sub> de una cadena B de insulina humana; X<sub>10</sub> es G o está ausente; X<sub>11</sub> es G, S o está ausente; X<sub>12</sub> es T o I; X<sub>13</sub> es D, Y, Q o E; X<sub>14</sub> es G, N, S o A; X<sub>15</sub> es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente, siempre que si X<sub>14</sub> es N, entonces X<sub>15</sub> debe ser un aminoácido diferente de G o N; X<sub>16</sub> es Q o E; X<sub>17</sub> es Q o E; X<sub>18</sub> es Q o E; X<sub>19</sub> es G, E, Q o está ausente; X<sub>20</sub> es G o está ausente; X<sub>21</sub> es G o está ausente; X<sub>22</sub> es E o P; X<sub>23</sub> es E o P; X<sub>24</sub> es A o V; X<sub>25</sub> es G o está ausente; X<sub>26</sub> es Q o H; X<sub>27</sub> es Y o F; X<sub>28</sub> es L o V; X<sub>29</sub> es S o A; X<sub>30</sub> es S o P; X<sub>31</sub> es A o T; X<sub>32</sub> es Q o R; X<sub>33</sub> es V o M; X<sub>34</sub> es R o K; X<sub>35</sub> es E o Q; y X<sub>36</sub> 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  
 ENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG  
 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 A<sub>1</sub>-A<sub>21</sub>, 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 B<sub>1</sub>-B<sub>30</sub>, 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 B<sub>16</sub>, B<sub>25</sub> o B<sub>27-30</sub>, que se representan en la SEC ID NO: 1 como posiciones X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6-9</sub>, respectivamente. Por ejemplo: X<sub>4</sub> (que corresponde con B<sub>16</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede modificar a E, Q o H; X<sub>5</sub> (que corresponde con B<sub>25</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede modificar a H; X<sub>6</sub> (que corresponde

con B<sub>27</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, S, H o V; X<sub>7</sub> (que corresponde con B<sub>28</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, E, K, D, S o H; X<sub>8</sub> (que  
5 corresponde con B<sub>29</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) se puede suprimir o modificar a G, E, P, Q, D o H; y X<sub>9</sub> (que corresponde con B<sub>30</sub> 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 B<sub>16</sub> y B<sub>25</sub> en el análogo de la cadena B de insulina - X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> 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 X<sub>1</sub> (que corresponde con B<sub>1</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) a Q o A; modificación de X<sub>2</sub> (que corresponde con B<sub>2</sub> en la cadena B de una molécula de insulina humana) a G; y/o modificación de X<sub>3</sub> (que corresponde con B<sub>3</sub> 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 X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6-9</sub> de la SEC ID NO: 1. En una modalidad

5 preferida, X<sub>4</sub> es E y X<sub>5</sub> es H. En ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos de X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> 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, X<sub>4</sub> es E, X<sub>5</sub> es H y X<sub>6-9</sub> es GGGG.

Cabe señalar que, mientras que X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> de SEC ID NO: 1

15 se describen anteriormente como comprendiendo el extremo C-terminal del análogo de la cadena B de insulina (Z<sub>1</sub>), 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 (Z<sub>2</sub>). Por ejemplo, en el contexto de la SEC ID NO: 4, X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> 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 X<sub>1</sub> (que corresponde con A<sub>10</sub> en la cadena A de una molécula de insulina humana) a T; modificación de X<sub>2</sub> (que se corresponde con A<sub>14</sub> en la cadena A de una molécula de insulina humana) a D, Q o E; y/o modificación  
10 de X<sub>3</sub> (que corresponde con A<sub>21</sub> en la cadena A de una molécula de insulina humana) a G, S o A. En una modalidad preferida, X<sub>1</sub> es T, X<sub>2</sub> es D, y X<sub>3</sub> 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, X<sub>3</sub> 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 X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> 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  $X_{14}$ , y el siguiente aminoácido,  $X_{15}$ , 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, GGKGGG, 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  $X_1$  es F;  $X_2$  es F;  $X_3$  es V;  $X_4$  es V;  $X_5$  es N;  $X_6$  es R; y  $X_7$  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  $X_1$  es F;  $X_2$  es F;  $X_3$  es V;  $X_4$  es V;  $X_5$  es N; y  $X_6$  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 X<sub>19</sub>-X<sub>22</sub> 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  
5 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.

10 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  
15 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  
20 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  
25 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ , 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<sup>a</sup> 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 X<sub>1</sub> 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  |
|    | FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG |     |     |     |     |     |
|    | 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 |
|    | GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS    |     |     |     |     |     |
|    | LG                                                            |     |     |     |     |     |
|    | (SEC ID NO: 17)                                               |     |     |     |     |     |

15

**Ejemplo 4:**

|    |                                                                |     |     |     |     |     |
|----|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | 10                                                             | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |
|    | FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG |     |     |     |     |     |
|    | 70                                                             | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 |
|    | GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE   |     |     |     |     |     |
| 20 | 130                                                            | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|    | DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP   |     |     |     |     |     |
|    | 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 |
|    | GQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS |     |     |     |     |     |
| 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

AGGQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGSGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG

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

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG

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  
 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKQ  
 190 200 210 220 230 240  
 5 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
 250 260 270 280 290  
 ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPG  
 (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-[<sup>125</sup>I]-yodotirosil-A<sup>14</sup>)-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 IC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> 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:**

| <b>Muestra</b>  | <b>Afinidad de Unión al Receptor, <math>K_i</math>, nM (SEM, n)</b> |                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                 | <b>hIR-A</b>                                                        | <b>hIR-B</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  $22.1 \pm 9.8$  mg/mL y  $1498 \pm 690$  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              | $335 \pm 104$         |
| 6              | $3559 \pm 447$        |
| 12             | $5991 \pm 1578$       |
| 24             | $10614 \pm 1334$      |
| 48             | $12629 \pm 1811$      |
| 96             | $8766 \pm 2028$       |
| 168            | $5017 \pm 253$        |

|     |             |
|-----|-------------|
| 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 <sub>0-∞</sub> (µg*h/mL) | 1066 ± 363  |
| C <sub>max</sub> (µg/mL)     | 6.81 ± 1.62 |
| T <sub>max</sub> (hr)        | 40 ± 14     |
| CL o CL/F<br>(mL/hr/kg)      | 2.15 ± 0.91 |
| t <sub>1/2</sub> (hr)        | 82 ± 12     |
| %F                           | 147         |

10

15

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

Abreviaturas: AUC<sub>0-∞</sub> - área bajo la curva desde 0 a infinito,

C<sub>max</sub> - concentración máxima, T<sub>max</sub> - tiempo a la máxima concentración, CL - depuración, F - biodisponibilidad, t<sub>1/2</sub> -

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

25

determinar la actividad del Ejemplo 1 en el hígado vs tejidos periféricos. Un bolo/infusión continua de 3-<sup>3</sup>H-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-<sup>14</sup>C]-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  $274 \pm 57$  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 IgG<sub>2</sub> 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<br>(horas) | Concentración ± 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 ± 212                    | NA          | 2190 ± 1369       | NA          |
| 1                 | 1172 ± 182                    | <43.75 ± NC | 1708 ± 1219       | <43.75 ± NC |
| 3                 | 863 ± 114                     | 87 ± 25     | 798 ± NC          | 92 ± 22     |
| 6                 | 726 ± 119                     | 272 ± 31    | 688 ± 96          | 209 ± 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 <sub>0-inf</sub> (µg*hr/mL) | 51.1 ± 6.4                    | 127 ± 7     | 62.7 ± 5.8        | 171 ± 17    |
| C <sub>max</sub> (µg/mL)        | 1.22 ± 0.22                   | 0.82 ± 0.06 | 2.24 ± 1.38       | 0.90 ± 0.21 |
| T <sub>max</sub> (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 <sub>1/2</sub> (hr)           | 61 ± 9                        | 70 ± 2      | 127 ± 18          | 148 ± 53    |
| V <sub>ss</sub> (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  $\mu$ 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 X<sub>1</sub> en la SEC ID NO: 2, Z<sub>3</sub> 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**

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>

en donde X<sub>1</sub> es F, Q o A; X<sub>2</sub> es V o G; X<sub>3</sub> es N, K, D, G, Q, A o E; X<sub>4</sub> es E, Y, Q, o H; X<sub>5</sub> es H o F; X<sub>6</sub> es G, T, S, H, V o está ausente; X<sub>7</sub> es G, E, P, K, D, S, H o está ausente; X<sub>8</sub> es G, E, K, P, Q, D, H o está ausente; X<sub>9</sub> 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 X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, o X<sub>9</sub>

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

GIVEQCCTSX<sub>1</sub>CSLX<sub>2</sub>QLENYCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

$X_1$  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 B<sub>16</sub>, B<sub>25</sub>, B<sub>27</sub>, B<sub>28</sub>, B<sub>29</sub> o B<sub>30</sub> 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**

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG

**SEC ID NO: 6 - Segundo enlazante de péptido**5 GGGGX<sub>1</sub>GGGGX<sub>2</sub>GGGGX<sub>3</sub>GGGGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>

en donde X<sub>1</sub> es Q o E; X<sub>2</sub> es Q o E; X<sub>3</sub> es Q o E; X<sub>4</sub> es G, E, Q o  
 está ausente; X<sub>5</sub> es G o está ausente; y X<sub>6</sub> es G o está ausente

**SEC ID NO: 7 - Segundo enlazante de péptido**

10 GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG

**SEC ID NO: 8 - Región Fc de IgG humana**

CPPCPAPELLGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
 HNAKTKPREEQYX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
 15 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

en donde X<sub>1</sub> es F, Q o E; X<sub>2</sub> es F, Q o E; X<sub>3</sub> es V o T; X<sub>4</sub> es V o  
 T; X<sub>5</sub> es N, D o Q; y  
 X<sub>6</sub> es K o está ausente

20

**SEC ID NO: 9 - Región Fc de IgG humana**

PCPPCPAPEAAGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSQEDPEVQFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
 25 LYSX<sub>6</sub>LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGX<sub>7</sub>

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 $X_5$ STFRVVS $X_6$ LT $X_7$ VVH $X_8$ QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNV $X_9$ FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX $X_6$

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**

$X_1$  $X_2$  $X_3$ QHLCSHLVEAL $X_4$ LVCGERGFX $X_5$ Y $X_6$  $X_7$  $X_8$  $X_9$  $X_{10}$ G $X_{11}$ GGGGGIVEQCCT $X_{12}$ CSL $X_{13}$   
3QLENYCX $X_{14}$  $X_{15}$ 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 $X_{26}$ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
 $X_{27}$ RVVSVLT $X_{28}$ V $X_{29}$ HQDWLNGKEYKCKVSNKGLP $X_{30}$  $X_{31}$ IEKTISK $X_{32}$ KGQPREPQVYTLPPS  
 $X_{33}$ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP $X_{34}$  $X_{35}$ LDSDGSFFLY $X_{36}$ LT  
VDKSRWQ $X_{37}$  $X_{38}$ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS $X_{39}$ 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<sub>16</sub>, B<sub>25</sub>, B<sub>27</sub>, B<sub>28</sub>, B<sub>29</sub> o B<sub>30</sub> de una cadena B de

insulina humana; X<sub>10</sub> es G o está ausente; X<sub>11</sub> es G, S o está  
 ausente; X<sub>12</sub> es T o I; X<sub>13</sub> es D, Y, Q o E; X<sub>14</sub> es G, N, S o A;  
 X<sub>15</sub> es cualquier aminoácido de origen natural, o está ausente,  
 siempre que si X<sub>14</sub> es N, entonces X<sub>15</sub> debe ser un aminoácido  
 5 diferente de G o N; X<sub>16</sub> es Q o E; X<sub>17</sub> es Q o E; X<sub>18</sub> es Q o E; X<sub>19</sub>  
 es G, E, Q o está ausente; X<sub>20</sub> es G o está ausente; X<sub>21</sub> es G o  
 está ausente; X<sub>22</sub> es E o P; X<sub>23</sub> es E o P; X<sub>24</sub> es A o V; X<sub>25</sub> es G  
 o está ausente; X<sub>26</sub> es Q o H; X<sub>27</sub> es Y o F; X<sub>28</sub> es L o V; X<sub>29</sub> es  
 S o A; X<sub>30</sub> es S o P; X<sub>31</sub> es A o T; X<sub>32</sub> es Q o R; X<sub>33</sub> es V o M; X<sub>34</sub>  
 10 es R o K; X<sub>35</sub> es E o Q; y X<sub>36</sub> 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 |
|    | HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG |     |     |     |     |     |
|    | 190                                                          | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 20 | LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP |     |     |     |     |     |
|    | 250                                                          | 260 | 270 | 280 | 290 |     |
|    | ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  |     |     |     |     |     |

**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 |     |
|    | PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG |     |     |     |     |     |

**SEC ID NO: 17 - Proteína de fusión**

|    |                                                               |     |     |     |     |     |
|----|---------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 20 | 10                                                            | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |
|    | FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG |     |     |     |     |     |
|    | 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 |
|   | GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS |     |     |     |     |     |
|   | LG                                                           |     |     |     |     |     |

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

|    |                                                              |     |     |     |     |     |
|----|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 10                                                           | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |
|    | FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG   |     |     |     |     |     |
|    | 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 |
|    | GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS |     |     |     |     |     |
| 20 | LG                                                           |     |     |     |     |     |

**SEC ID NO: 21 - Proteína de fusión**

|    |                                                             |    |    |     |     |     |
|----|-------------------------------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|
|    | 10                                                          | 20 | 30 | 40  | 50  | 60  |
|    | AGGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG |    |    |     |     |     |
| 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  
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**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  
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

**SEC ID NO: 23 - Proteína de fusión**

10 20 30 40 50 60  
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSI CSLYQLENYCGGGG  
70 80 90 100 110 120  
25 GSGGGGSGGGGSGGGGSECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

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

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de fusión, caracterizada porque comprende:

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 comprende la secuencia de aminoácidos:

$X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

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 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);

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 comprende la secuencia de aminoácidos:

$GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

en donde  $X_1$  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);

- 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 segundo enlazante de péptido se fusiona directamente al residuo N-terminal of la región Fc de IgG humana.

2. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque:

el análogo de la cadena B de insulina incluye al menos una modificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de insulina humana en  $X_4$  o  $X_5$  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  $X_1$  o  $X_2$  de SEC ID NO: 2.

3. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque:

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

el análogo de la cadena A de insulina comprende 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.

4. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque el análogo de la cadena B de insulina comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, en donde  $X_6$ - $X_9$  son cada uno G.

5. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizada porque el primer enlazante de péptido comprende la siguiente 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).

6. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque  $X_1$  y  $X_2$  de SEC ID NO: 3 son G y S, respectivamente.

7. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque el agonista del receptor de insulina tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG

(SEC ID NO: 5).

8. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizada porque

el segundo enlazante de péptido es un péptido que tiene entre 10 y 25 aminoácidos, en donde al menos 50% de los aminoácidos son residuos G.

9. La proteína de fusión de conformidad con  
5 cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizada porque el segundo enlazante de péptido comprende un péptido que tiene la secuencia  $[GGGGX]_n$  en donde X es Q, E o S; y en donde  $n$  es 2-5.

10. La proteína de fusión de conformidad con  
10 cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizada porque el segundo enlazante de péptido comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

$GGGGX_1GGGGX_2GGGGX_3GGGGX_4X_5X_6$

$X_1$  es Q o E

15  $X_2$  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

20 (SEC ID NO: 6).

11. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizada porque el segundo enlazante de péptido tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

25 GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEC ID NO: 7).

12. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizada porque la región Fc de IgG humana es una región Fc de una IgG1, IgG2 o IgG4.

5 13. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizada porque la región Fc de IgG humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 10.

10 14. Una proteína de fusión, caracterizada porque tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12.

15 15. Un homodímero de dos proteínas de fusión, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

16 16. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende ya sea una proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o un homodímero de conformidad con la reivindicación 15, y al menos un excipiente.

20 17. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque la composición comprende adicionalmente uno o más agentes amortiguadores, uno o más tensioactivos, y uno o más agentes de isotonicidad.

25 18. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque comprende adicionalmente citrato, ácido cítrico, polisorbato 80, y manitol.

19. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-18, caracterizada porque el pH varía desde aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8.0.

20. La composición farmacéutica de conformidad con  
5 cualquiera de las reivindicaciones 16-19, caracterizada porque el pH varía desde aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.75.

21. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-20, caracterizada porque adicionalmente comprende un ingrediente activo adicional.

10 22. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque el ingrediente activo adicional es una terapia basada en la incretina.

23. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada porque la terapia basada en  
15 la incretina es un agonista de GLP-1R.

24. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada porque el agonista de GLP-1R es dulaglutida.

25. Una composición farmacéutica, caracterizada  
20 porque comprende un homodímero de conformidad con la reivindicación 15 y dulaglutida.

26. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizada para uso en terapia.

25 27. La proteína de fusión de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizada para uso en el tratamiento de diabetes mellitus.

28. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizada para uso  
5 en la combinación simultánea, separada o secuencial con un ingrediente activo adicional.

29. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizada para uso en la combinación simultánea, separada o secuencial con  
10 dulaglutida.

30. El homodímero de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado para uso en la combinación simultánea, separada o secuencial con dulaglutida.

31. Un polinucleótido, caracterizado porque codifica  
15 la proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

20

25

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un agonista del receptor de insulina fusionado a una región Fc de IgG humana mediante el uso de un  
5   enlazante de péptido, y el uso de tales proteínas de fusión en el tratamiento de diabetes. La proteína de fusión de la presente invención tiene un perfil de acción de tiempo prolongado y es útil para proporcionar un control de glucosa basal durante un período de tiempo prolongado.

10

15

20

25

# SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> FUSION PROTEINS

<130> X20356

<150> 62/158079

<151> 2015-05-07

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is Phe, Gln or Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Val or Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa at position 3 is Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala or Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is Glu, Tyr, Gln or His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa at position 25 is His or Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa at position 27 is Gly, Thr, Ser, His, Val, or is absent

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Xaa at position 28 is Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, or is absent  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa at position 29 is Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, or is absent  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Xaa at position 30 is Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, or is absent  
  
 <400> 1

Xaa Xaa Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa  
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa at position 10 is Thr or Ile

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa at position 14 is Asp, Tyr, Gln or Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa at position 21 is Gly, Asn, Ser, or Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is any naturally occurring amino acid, or is absent

<400> 2

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Xaa Cys Ser Leu Xaa Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa  
20

<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa at position 1 is Gly or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa at position 3 is Gly, Ser, or is absent

<400> 3

Xaa Gly Xaa Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 4  
<211> 59  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa at position 1 is Phe, Gln, or Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)  
<223> Xaa at position 2 is Val or Gly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa at position 3 is Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa at position 16 is Glu, Tyr, Gln, or His

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (25)..(25)  
<223> Xaa at position 25 is His or Phe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(27)  
<223> Xaa at position 27 is Gly, Thr, Ser, His, Val, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (28)..(28)  
<223> Xaa at position 28 is Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(29)  
<223> Xaa at position 29 is Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (30)..(30)  
<223> Xaa at position 30 is Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(31)  
<223> Xaa at position 31 is Gly or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (33)..(33)  
<223> Xaa at position 33 is Gly, Ser, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (47)..(47)  
<223> Xaa at position 47 is Thr or Ile

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(51)  
 <223> Xaa at position 51 is Asp, Tyr, Gln, or Glu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (58)..(58)  
 <223> Xaa at position 58 is Gly, Asn, Ser, or Ala  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (59)..(59)  
 <223> Xaa at position 59 is any naturally occurring amino acid, or is absent

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa  
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly  
 20 25 30

Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Xaa Cys  
 35 40 45

Ser Leu Xaa Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa  
 50 55

<210> 5  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 5

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly  
50 55

<210> 6  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa at position 5 is Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa at position 10 is Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (15)..(15)  
<223> Xaa at position 15 is Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa at position 20 is Gly, Glu, Gln, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (21)..(21)  
<223> Xaa at position 21 is Gly or absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)  
<223> Xaa at position 21 is Gly or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)  
<223> Xaa at position 22 is Gly or is absent

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa  
20

<210> 7  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly  
20

<210> 8  
<211> 222  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa at position 16 is Phe, Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa at position 18 is Phe, Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (37)..(37)  
<223> Xaa at position 37 is Val or Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (39)..(39)  
<223> Xaa at position 39 is Val or Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> Xaa at position 72 is Asn, Asp or Gln

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (222)..(222)  
 <223> Xaa at position 222 is Lys or is absent

<400> 8

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Xaa  
 1 5 10 15

Leu Xaa Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Xaa Val Xaa Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215 220

<210> 9  
<211> 223  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (17)..(17)  
<223> Xaa at position 17 is Phe, Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (19)..(19)  
<223> Xaa at position 19 is Phe, Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (38)..(38)  
<223> Xaa at position 38 is Val or Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> Xaa at position 40 is Val or Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (73)..(73)  
<223> Xaa at position 73 is Asn, Asp or Gln

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (185)..(185)  
<223> Xaa at position 185 is Arg or Lys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (223)..(223)

<223> Xaa at position 223 is Lys or is absent

<400> 9

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Xaa Val Xaa Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
115 120 125

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Xaa Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
180 185 190

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
210 215 220

<210> 10  
<211> 222  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa at position 16 is Phe, Gln, or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa at position 18 is Phe, Gln, or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (37)..(37)  
<223> Xaa at position 37 is Val or Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (39)..(39)  
<223> Xaa at position 39 is Val or Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (72)..(72)  
<223> Xaa at position 72 is Asn, Asp, or Gln

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (222)..(222)  
<223> Xaa at position 222 is Lys or is absent

<400> 10

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Xaa  
1 5 10 15

Leu Xaa Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

20

25

30

Glu Val Thr Cys Xaa Val Xaa Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75 80

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp  
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
 210 215 220

<210> 11  
 <211> 303  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is Phe, Gln, or Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Val or Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa at position 3 is Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, or Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is Glu, Tyr, Gln, or His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa at position 25 is His or Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa at position 27 is Gly, Thr, Ser, His, Val, or is absent

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa at position 28 is Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, or is absent

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, or is absent

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa at position 30 is Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, or is absent

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(31)  
<223> Xaa at position 31 is Gly, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (33)..(33)  
<223> Xaa at position 33 is Gly, Ser, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (47)..(47)  
<223> Xaa at position 47 is Thr or Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (51)..(51)  
<223> Xaa at position 51 is Asp, Tyr, Gln, or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (58)..(58)  
<223> Xaa at position 58 is Gly, Asn, Ser or Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (59)..(59)  
<223> Xaa at position 59 is any naturally occurring amino acid, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (64)..(64)  
<223> Xaa at position 64 is Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (69)..(69)  
<223> Xaa at position 69 is Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (74)..(74)  
<223> Xaa at position 74 is Gln or Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (79)..(79)  
<223> Xaa at position 79 is Gly, Glu, Gln, or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (80)..(80)  
<223> Xaa at position 80 is Gly or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (81)..(81)  
<223> Xaa at position 81 is Gly or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (82)..(82)  
<223> Xaa at position 82 is Glu or Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (90)..(90)  
<223> Xaa at position 90 is Glu or Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (91)..(91)  
<223> Xaa at position 91 is Ala and Val

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (94)..(94)  
<223> Xaa at position 94 is Gly or is absent

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (125)..(125)  
<223> Xaa at position 125 is Gln or His

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (157)..(157)  
<223> Xaa at position 157 is Tyr or Phe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (166)..(166)  
<223> Xaa at position 166 is Leu or Val

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (187)..(187)  
<223> Xaa at position 187 is Ser or Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (188)..(188)  
<223> Xaa at position 188 is Ser or Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (196)..(196)

<223> Xaa at position 196 is Ala or Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (212)..(212)

<223> Xaa at position 212 is Gln or Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (254)..(254)

<223> Xaa at position 254 is Val or Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (266)..(266)

<223> Xaa at position 266 is Arg or Lys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (276)..(276)

<223> Xaa at position 276 is Glu or Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (302)..(302)

<223> Xaa at position 302 is Leu or Pro

<400> 11

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Xaa | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Xaa |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Xaa | Tyr | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Gly |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Thr | Ser | Xaa | Cys |
|     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Xaa | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Xaa | Xaa | Gly | Gly | Gly | Gly | Xaa |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Gly | Gly | Xaa | Gly | Gly | Gly | Gly | Xaa | Gly | Gly | Gly | Gly | Xaa | Xaa |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Xaa | Xaa | Ala | Gly | Xaa | Pro | Ser |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[illegible]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
85 90 95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
100 105 110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
145 150 155 160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
165 170 175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
180 185 190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
195 200 205

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 13  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn  
20

<210> 14  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
20 25 30

<210> 15  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 16  
<211> 300  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 16

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Glu Thr Gly Gly  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
85 90 95

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 |
| Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 |
| Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 |
| Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 |
| Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 |
| Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 |
| Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 |
| His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly                 |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 |
|                                                                 |     | 300 |

<210> 17  
 <211> 302  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly  
65 70 75 80

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
85 90 95

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
100 105 110

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
115 120 125

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
130 135 140

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
165 170 175

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
180 185 190

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
195 200 205

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
210 215 220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
225 230 235 240

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 18  
<211> 297  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 18

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly  
50 55 60

Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Glu Cys Pro Pro  
65 70 75 80

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
130 135 140

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val  
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
165 170 175

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly  
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

|                                                                 |                     |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|-----|--|-----|
| 275                                                             |                     | 280 |  | 285 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly                             |                     |     |  |     |
| 290                                                             |                     | 295 |  |     |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| <210>                                                           | 19                  |     |  |     |
| <211>                                                           | 302                 |     |  |     |
| <212>                                                           | PRT                 |     |  |     |
| <213>                                                           | Artificial Sequence |     |  |     |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| <220>                                                           |                     |     |  |     |
| <223>                                                           | Synthetic Construct |     |  |     |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| <400>                                                           | 19                  |     |  |     |
| Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu |                     |     |  |     |
| 1                                                               | 5                   | 10  |  | 15  |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly |                     |     |  |     |
|                                                                 | 20                  | 25  |  | 30  |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys |                     |     |  |     |
|                                                                 | 35                  | 40  |  | 45  |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly |                     |     |  |     |
|                                                                 | 50                  | 55  |  | 60  |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly |                     |     |  |     |
| 65                                                              |                     | 70  |  | 75  |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val |                     |     |  |     |
|                                                                 | 85                  | 90  |  | 95  |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr |                     |     |  |     |
|                                                                 | 100                 | 105 |  | 110 |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu |                     |     |  |     |
|                                                                 | 115                 | 120 |  | 125 |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys |                     |     |  |     |
|                                                                 | 130                 | 135 |  | 140 |
|                                                                 |                     |     |  |     |
| Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser |                     |     |  |     |

145 150 155 160

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
165 170 175

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
180 185 190

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
195 200 205

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
210 215 220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
225 230 235 240

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 20  
<211> 302  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 20

Phe Val Gly Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly

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

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 21  
<211> 297  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 21

Ala Gly Gly Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly  
50 55 60

Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Glu Cys Pro Pro  
65 70 75 80

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
130 135 140

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val  
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
165 170 175

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly  
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 22  
<211> 299  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys Thr Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
85 90 95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
100 105 110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
145 150 155 160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
165 170 175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
180 185 190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

|       |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 195   |                     | 200 |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu   | Glu                 | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly |
| 210   |                     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Phe   | Tyr                 | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro |
| 225   |                     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Glu   | Asn                 | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser |
|       |                     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Phe   | Phe                 | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln |
|       |                     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |
| Gly   | Asn                 | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His |
|       |                     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Tyr   | Thr                 | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly |     |     |     |     |     |
| 290   |                     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> | 23                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> | 298                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> | PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> | Artificial Sequence |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220> |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223> | Synthetic Construct |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> | 23                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe   | Val                 | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Glu |
| 1     |                     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu   | Val                 | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Glu | Glu | Thr | Gly | Gly |
|       |                     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly   | Gly                 | Gly | Gly | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Thr | Ser | Ile | Cys | Ser |
|       |                     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu   | Tyr                 | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly |
|       | 50                  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly   | Gly                 | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Cys | Pro |

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 24  
<211> 299  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 24

Phe Val Gly Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
85 90 95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
100 105 110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
145 150 155 160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
165 170 175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
180 185 190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
195 200 205

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 25  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

|                      |
|----------------------|
| To:                  |
| see form PCT/ISA/220 |

## PCT

### WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

|                                                    |                                                          |                                              |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| International application No.<br>PCT/US2016/029807 | International filing date (day/month/year)<br>28.04.2016 | Priority date (day/month/year)<br>07.05.2015 |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. C07K14/62 A61K38/28 C12N15/62

Applicant  
ELI LILLY AND COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

|                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |                                                                            |                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA:<br><br>European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Date of completion of<br>this opinion<br><br>see form<br>PCT/ISA/210 | Authorized Officer<br><br>Mabit, Hélène<br><br>Telephone No. +49 89 2399-0 |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|

---

**Box No. I Basis of the opinion**

---

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed.
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
  - a. ☒ forming part of the international application as filed:
    - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - ☐ on paper or in the form of an image file.
  - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

---

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

---

1. Statement

|                               |             |             |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | <u>1-37</u> |
|                               | No: Claims  |             |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |             |
|                               | No: Claims  | <u>1-37</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-37</u> |
|                               | No: Claims  |             |

2. Citations and explanations

see separate sheet

**Re Item V**

**Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. The present invention relates to fusion proteins comprising an insulin receptor agonist of formula Z1-Z2-Z3 (see claim 1) fused to a human IgG Fc region with a peptide linker for use in the treatment of diabetes. The present application discloses 10 specific fusion proteins (SEQ ID N°12, 16-24).

2. Reference is made to the following documents:

D1: CN103509118

D2: KR101324828

D3: WO2005000892

As mentioned in the description, D1 describes proteins with a human insulin B-chain and human insulin A-chain joined by a 4 to 50 aa C-peptide connection sequence, and with the insulin A-chain attached directly, without an additional linker, to an immunoglobulin Fc fragment.

D2 is also cited in the description. It describes proinsulin analogs linked to immunoglobulin Fc regions through the use of non-peptidyl linkers.

D3 discloses GLP-1 analogs fused to specific IgG4-Fc derivatives. A Glycine-rich peptide linker links both parts. The peptide linker optimizes the in vivo function and stability. It prevents potentially unwanted domain interactions. Further, it provides some structural flexibility such that the GLP-1 analog portion can interact productively with the GLP-1 receptor on target cells such as the beta cells of the pancreas. The preferred glycine-rich linker comprises the sequence: GGGSGGGSGGGSGGGS

**3. Novelty**

Claim 1 is novel over D1 because the fusion protein of D1 lacks the linker between the insulin analog and the IgG-Fc part. Claim 1 is novel over D2 because in D2 the linker between the insulin analog and the IgG-Fc part is a non-peptidyl linker. Finally, claim 1 is novel over D3 because in D3, GLP-1- IgG Fc fusion protein are concerned.

#### 4. Inventive step

D1 represents the closest prior art.

The claimed subject matter differs from D1 by the presence of a peptide linker between the insulin analog and the IgG-Fc part of the fusion protein.

However, the presence of a peptide linker is known in the field of fusion protein with IgG-Fc and has already been employed for the same purpose of stability (see D3). It would be obvious to the person skilled in the art, namely when the same result is to be achieved, to apply this features with corresponding effect to a fusion protein according to D1, thereby arriving at the subject matter of claim 1. Thus, an inventive step cannot be acknowledged for the subject matter of claim 1.

Claims related or dependent thereof do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which it refers, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step.

#### Further remark

Claims 26-31 are directed to a method of treatment of the human or animal body. No unified criteria exist in the PCT contracting states regarding said claims. However, when entering the regional phase before the EPO, an objection has to be expected since methods of treatment are exempt from patentability.

(10) International Publication Number  
**WO 2016/178905 A1**(43) International Publication Date  
10 November 2016 (10.11.2016)

## (51) International Patent Classification:

C07K 14/62 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)  
A61K 38/28 (2006.01)

## (21) International Application Number:

PCT/US2016/029807

## (22) International Filing Date:

28 April 2016 (28.04.2016)

## (25) Filing Language:

English

## (26) Publication Language:

English

## (30) Priority Data:

62/158,079 7 May 2015 (07.05.2015) US

(71) Applicant: ELI LILLY AND COMPANY [US/US];  
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

## (72) Inventors: BALDWIN, David Bruce; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). BEALS, John Michael; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). DAY, Jonathan Wesley; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). DICKINSON, Craig Duane; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). KORYTKO, Andrew Ihor; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

LAZAR, Gregory Alan; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

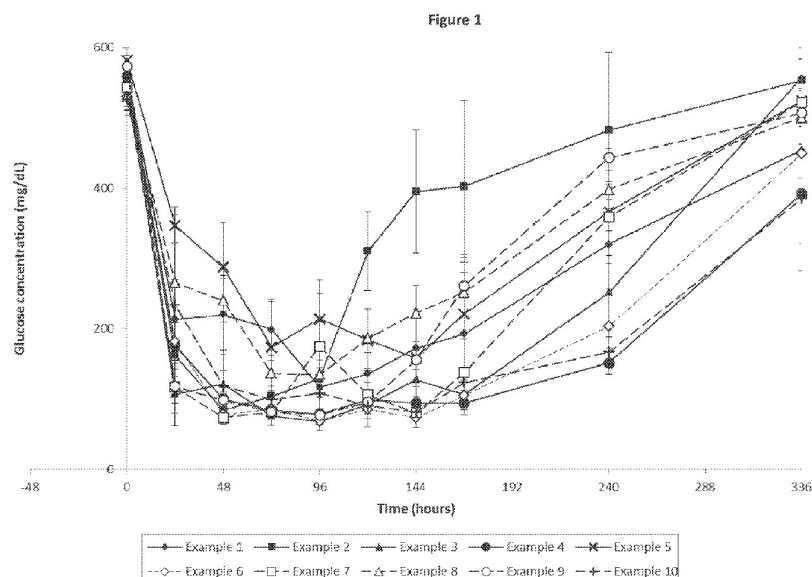
## (74) Agents: LORD, Matthew T. et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

## (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

[Continued on next page]

## (54) Title: FUSION PROTEINS



(57) Abstract: The present invention relates to fusion proteins comprising an insulin receptor agonist fused to a human IgG Fc region through the use of a peptide linker, and the use of such fusion proteins in the treatment of diabetes. The fusion protein of the present invention has an extended time action profile and is useful for providing basal glucose control for an extended period of time.

**Declarations under Rule 4.17:**

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

**Published:**

- *with international search report (Art. 21(3))*
- *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*