



MD/EP 3292141 T2 2020.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3292141 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 14/62 (2006.01.01)
A61K 38/28 (2006.01.01)
C12N 15/62 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0255 (22) Data de depozit: 2016.04.28 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16721605.0, 2016.04.28 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3292141, 2020.02.12 (31) Numărul cererii prioritare: 201562158079 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.05.07 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2020, 2020.07.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 07/2020, 2020.02.12 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2018, 2018.04.30
(71) Solicitant: Eli Lilly and Company, US (72) Inventatori: BALDWIN David Bruce, US; BEALS John Michael, US; DAY Jonathan Wesley, US; DICKINSON Craig Duane, US; KORYTKO Andrew Ihor, US; LAZAR Gregory Alan, US (73) Titular: Eli Lilly and Company, US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru; PARASCA Dumitru	

(54) Proteine de fuziune

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la proteine de fuziune care cuprind un agonist al receptorului de insulină fuzionat la o regiune IG Fc umană prin utilizarea unei agent de legătură peptidic, și utilizarea unor astfel de proteine de fuziune în tratamentul diabetului. Proteinele de fuziune ale prezentei invenții au un profil de acțiune

2

extins în timp și sunt utile în furnizarea controlului glucozei de bază pe o perioadă extinsă de timp.

Secvențe: 25

Revendicări: 23

Figuri: 2

MD/EP 3292141 T2 2020.07.31

(54) Fusion proteins**(57) Abstract:**

1

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

2

an extended time action profile and is useful for providing basal glucose control for an extended period of time.

Sequences: 25

Claims: 23

Fig.: 2

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Prezenta invenție se referă la proteine de fuziune pentru utilizare în tratamentul diabetului. Mai special, invenția se referă la proteine de fuziune care cuprind un agonist al receptorului pentru insulină fuzionat la o regiune IgG Fc umană cu un agent de legătură peptidic, și utilizarea de astfel de proteine în tratamentul diabetului. Proteinele de fuziune din prezenta invenție au un profil de acțiune extins în timp și sunt utile pentru asigurarea controlului prelungit al glucozei de bază și suprimarea producției de glucoză hepatică.

Diabetul zaharat este o tulburare cronică caracterizată prin hiperglicemie care rezultă din defecte în secreția insulinei, acțiunea insulinei, sau a ambelor. Diabetul zaharat de tip 1 este caracterizat printr-o mică capacitate, sau fără capacitatea de a secreta insulină, și pacienții cu diabet zaharat de tip 1 necesită insulină pentru supraviețuire. Diabetul zaharat de tip 2 este caracterizat prin niveluri ridicate de glucoză în sânge care rezultă din alterarea secreției de insulină, rezistență la insulină, producție excesivă de glucoză hepatică, și/sau forme de contribuție ale tuturor celor de mai sus. La cel puțin o treime din pacienții cu diabet zaharat de tip 2, boala progresează până la o cerință absolută pentru terapia cu insulină.

Pentru a obține o glicemie normală, este dorită în paralel, cât mai strâns posibil, terapia cu înlocuirea insulinei, tiparul secreției endogene de insulină la indivizii normali. Cererea fiziologică zilnică de insulină fluctuează și poate fi separată în două faze: (a) faza din timpul mesei care necesită un impuls (bolus) de insulină pentru a elimina valul de glucoză legată de masă din sânge, și (b) faza dintre mese care necesită o cantitate susținută (de bază) de insulină pentru reglarea producției de glucoză hepatică pentru a menține staționară glucoza optimă în sânge.

Deoarece pacienții cu diabet de tip 1 produc puțină sau nu produc deloc insulină, terapia eficientă cu insulină pentru diabeticii de tip 1, implică în general utilizarea a două tipuri de insulină administrată exogen: o insulină care acționează rapid, în timpul mesei furnizată prin injecții bolus, și o insulină de bază care acționează pe termen lung, administrată o dată sau de două ori zilnic pentru a controla nivelurile de glucoză în sânge între mese. Tratamentul pacienților cu diabet de tip 2 începe de obicei cu prescrierea pierderii în greutate, exerciții, și o dietă diabetică, dar când aceste măsuri eșuează în controlul zaharurilor ridicate din sânge, atunci pot fi necesare medicații orale și terapii pe bază de incretin, cum ar fi administrarea de agoniști receptori ai peptidei-1 cum ar fi glucagon (GLP-1) și/sau inhibitori ai dipeptidil peptidazei 4 (DPP-4) care permit niveluri crescute de incretin. Când aceste medicații sunt încă insuficiente, este luat în considerare tratamentul cu insulină. Pacienții cu diabet de tip 2 a căror boală a avansat până la punctul în care este necesară terapia cu insulină, încep în general cu o singură injecție zilnică cu insulină de bază care acționează pe termen lung, deși dacă este necesar, în unele cazuri, pot fi incluse și injecții cu insulină în timpul mesei care acționează rapid.

Câteva tipuri de insuline de bază sunt disponibile în prezent. Insulina glargină, vândută sub marca LANTUS®, cuprinde o structură de insulină modificată în care asparagina la poziția 21 în catena A de insulină este înlocuită cu glicină, și două arginine se adaugă la C-terminalul catenei B. Insulina detemir, vândută sub marca LEVEMIR®, cuprinde o structură de insulină modificată în care treonina la poziția 30 a catenei B a fost ștearsă și lizina la poziția 29 a catenei B a fost derivatizată prin legătura covalentă a unui carbon 14, acid gras al miristoilului la gruparea ε-amină a lizinei la B29. Insulina degludec, disponibilă în Europa și Japonia sub marca TRESIBA®, cuprinde o structură de insulină modificată în care treonina la poziția 30 a catenei B a fost ștearsă, și gruparea ε-amino a lizinei la poziția 29 a catenei B este derivatizată covalent cu acid hexadecandioic printr-un agent de legătură al acidului γ-L-glutamic. Toate aceste insuline sunt indicate pentru administrare o dată pe zi.

Regimurile de tratament care implică injecții zilnice ale terapiilor cu insulină existente, pot fi complicate și dureroase pentru administrare și pot conduce la efecte secundare nedorite, cum ar fi hipoglicemia și câștigul în greutate. Prin urmare, mulți pacienți diabetici nu dorec sau nu pot respecta, sau sunt incapabili să se conformeze, cu terapia cu insulină necesară pentru a menține un control strâns al nivelurilor de glucoză în sânge. Slabul control glicemic crește riscul pacientului de a dezvoltă complicații serioase legate de diabet, incluzând boli de inimă, accident vascular cerebral, deteriorare nervoasă, amputarea membrilor inferioare, pierderea vederii, și boli renale. Cercetarea a fost efectuată pentru a identifica produse de insulină cu durată de acțiune mai lungă; astfel, necesitând mai puține injecții decât produsele de insulină disponibile în prezent pentru a îmbunătăți acceptarea și conformitatea.

CN103509118 descrie proteine cu o catenă B de insulină umană și o catenă A de insulină umană unite printr-o secvență de conexiune cu 4 până la 50 de C-peptide de aminoacizi, și cu

catena A de insulină atașată direct, fără un agent de legătură suplimentar, la un fragment Fc de imunoglobulină, și afirmă că testarea pe șoareci arată că astfel de proteine au perioada de înjumătățire in vivo de aproximativ 3 zile. KR101324828 descrie analogi de proinsulină legați la regiunile Fc de imunoglobulină prin utilizarea de agenți de legătură non-peptidici, și afirmă că astfel de proteine furnizează o perioadă de înjumătățire crescută a serului față de terapiile existente. Publicația afirmă că agenții de legătură non-peptidici reprezintă o îmbunătățire față de agenții de legătură peptidici, afirmând că proteinele de fuziune care utilizează agenți de legătură peptidici nu pot crește perioada de înjumătățire a unei medicații active în sânge deoarece agenții de legătură peptidici sunt separați ușor de enzime în corp.

În ciuda dezvăluirilor de mai sus, și/sau în orice alte publicații, prezenții inventatori au depășit multiple obstacole pentru a descoperi proteinele de fuziune care cuprind agoniști receptori de insulină, agenți de legătură peptidici, și regiuni IgG Fc umane care întâmpină necesitatea continuă pentru produse cu glucoză scăzută cu o durată crescută de acțiune, suficientă pentru o dozare mai puțină frecventă decât la produsele de insulină disponibile în prezent, incluzând dozarea rarită, cum ar fi o dată pe săptămână. De exemplu, pentru a obține un profil de acțiune dorit prelungit în timp, a fost necesară modificarea genetică a proteinelor de fuziune cu potență atenuată pentru a evita eliberarea rapidă mediată de receptor, a căii majore de eliberare a insulinei, dar care au încă destulă potență pentru a furniza scăderea suficientă a glucozei. În plus, pentru a minimiza eliberarea renală, cealaltă cale majoră de eliberare a insulinei, și pentru a regla expunerea periferică prin difuzie paracelulară limitată la dimensiuni hidrodinamice, proteinele de fuziune care au fost suficient de mari, și care nu ar fi trebuit să aibă agonistul receptor pentru insulină clivat proteolitic din regiunea IgG Fc umană după ce au fost administrate, au trebuit să fie modificate genetic, deoarece o astfel de clivare ar conduce la o eliberare renală mai rapidă ca cea dorită a agonistului receptor al insulinei, chiar dacă regiunea IgG Fc umană a rămas în circulație. În plus, domeniile IgG Fc au evoluat la autoasocieri pentru a forma dimeri stabili, și când un astfel de dimer este format din două proteine de fuziune, cuprinzând fiecare un radical de insulină fuzionat cu o regiune IgG Fc, cei doi radicali de insulină sunt aduși într-o proximitate strânsă unul cu celălalt, permițând autoasocierea, sau dimerizarea, radicalilor de insulină, mediați prin regiunile autoasociate ale catenei B de insulină. Astfel de dimeri de insulină sunt inactivi, deci proteinele de fuziune cu autoasociere redusă a radicalilor agoniști ai receptorului de insulină au trebuit să fie modificate genetic. Au fost depășite multiple provocări suplimentare pentru a crea o proteină de fuziune adecvată pentru fabricare comercială și formulare ca terapeutic. Prezenta invenție furnizează proteine de fuziune care au durată de acțiune prelungită în comparație cu tratamentele cu insulină existente, permițând injecții mai puțin frecvente decât produsele de insulină existente, incluzând până la o dată săptămânal, reducând astfel complexitatea și durerea asociate cu regimurile de tratament existente care implică injectarea mai frecventă. Proteinele de fuziune din prezenta invenție au un profil farmacocinetic plat și o expunere periferică restricționată, conducând la o variabilitate scăzută zi de zi, și la o incidență minimă asupra hipoglicemiei, inclusiv când sunt furnizate în combinație cu o medicație suplimentară pentru diabet, cum ar fi o terapie pe bază de incretin. Proteinele de fuziune din prezenta invenție pot furniza de asemenea o durată de acțiune prelungită fără să cauzeze câștig în greutate.

Prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune care cuprinde:

- a) un agonist receptor pentru insulină care are formula generală $Z_1-Z_2-Z_3$, în care
 - i) Z_1 este un analog al catenei B de insulină, care cuprinde secvența de aminoacizi:

45 $X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALXLVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

în care X_1 este F, Q sau A; X_2 este V sau G; X_3 este N, K, D, G, Q, A sau E; X_4 este E, Y, Q, sau H; X_5 este H sau F; X_6 este G, T, S, H, V sau este absent; X_7 este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X_8 este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X_9 este G, T, S, E, K, A sau este absent, cu condiția ca analogul catenei B de insulină să includă cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 (SEQ ID NO:1);
 - ii) Z_2 este un prim agent de legătură peptidic care cuprinde 5 până la 10 aminoacizi, în care cel puțin 5 din respectivii aminoacizi sunt reziduuri G; și
 - iii) Z_3 este un analog al catenei A de insulină cuprinzând secvența de aminoacizi:

55 $GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

X_1 este T sau I; X_2 este D, Y, Q sau E; X_3 este G, N, S sau A; și X_4 este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că dacă X_3 este N, atunci X_4 trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N (SEQ ID NO:2);
- a) un al doilea agent de legătură peptidic care are între 10 și 25 aminoacizi, în care cel puțin 50% din respectivii aminoacizi sunt reziduuri G; și
- b) o regiune IgG Fc umană;

în care reziduul C-terminal al agonistului receptor al insulinei este direct fuzionat la reziduul N-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic, și reziduul C-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic este direct fuzionat la reziduul N-terminal al regiunii IgG Fc.

Prezenta invenție furnizează de asemenea o proteină de fuziune care constă din:

- 5 a) un agonist receptor al insulinei având formula generală $Z_1-Z_2-Z_3$, în care
 - i) Z_1 este un analog al catenei B de insulină, având secvența de aminoacizi: $X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$ în care X_1 este F, Q sau A; X_2 este V sau G; X_3 este N, K, D, G, Q, A sau E; X_4 este E, Y, Q, sau H; X_5 este H sau F; X_6 este G, T, S, H, V sau este absent; X_7 este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X_8 este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X_9 este G, T, S, E, K, A sau este absent, cu condiția că analogul catenei B de insulină să includă cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 (SEQ ID NO:1);
 - 10 ii) Z_2 este un prim agent de legătură peptidic care cuprinde 5 până la 10 aminoacizi, în care cel puțin 5 din respectivii aminoacizi sunt reziduuri G; și
 - 15 iii) Z_3 este un analog al catenei A de insulină care are secvența de aminoacizi: $GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$ X_1 este T sau I; X_2 este D, Y, Q sau E; X_3 este G, N, S sau A; și X_4 este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că dacă X_3 este N, atunci X_4 trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N (SEQ ID NO:2);
 - 20 b) un al doilea agent de legătură peptidic având între 10 și 25 aminoacizi, în care cel puțin 50% din respectivii aminoacizi sunt reziduuri G; și
 - c) o regiune IgG Fc umană;

- 25 în care reziduul C-terminal al agonistului receptor al insulinei este direct fuzionat la reziduul N-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic, și reziduul C-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic este direct fuzionat la reziduul N-terminal al regiunii IgG Fc.

Prezenta invenție furnizează de asemenea o compoziție farmaceutică care cuprinde o proteină de fuziune din prezenta invenție și cel puțin un excipient acceptabil farmaceutic.

- 30 Prezenta invenție furnizează de asemenea o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratarea diabetului zaharat, obezității, dislipidemiei sau sindromului metabolic. Prezenta invenție furnizează de asemenea o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratarea sau prevenirea afecțiunilor asociate cu diabetul selectate din grupul care constă din boli de inimă, accident vascular cerebral, nefropatie, retinopatie, și boli renale.

- 35 Invenția furnizează de asemenea o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în terapie.

Prezenta invenție furnizează de asemenea utilizarea unei proteine de fuziune din prezenta invenție în fabricarea unui medicament.

Prezenta invenție furnizează de asemenea polinucleotide care codifică o proteină de fuziune din prezenta invenție.

- 40 De asemenea este furnizat aici este un procedeu pentru producerea unei proteine de fuziune din prezenta invenție, respectivul procedeu cuprinzând etapele de:

1. cultivare a unei celule gazdă de mamifer cuprinzând o polinucleotidă care codifică o proteină de fuziune din prezenta invenție în condiții astfel încât respectiva proteină de fuziune să fie exprimată; și
- 45 2. recuperare din respectiva celulă gazdă a proteinei de fuziune;

De asemenea este furnizată aici o proteină de fuziune produsă prin procedeul descris mai sus.

Figura 1. Figura 1 furnizează date farmacodinamice pentru exemple de proteine de fuziune din prezenta invenție într-un model de diabet pe șobolan tratat cu streptozotocin (STZ).

- 50 **Figura 2.** Figura 2 furnizează o diagramă schematică de configurații ale proteinelor descrise aici. Ar trebui să se observe că formele particulare (de exemplu, ovale, semicercuri, etc.) utilizate în diagramele din Figura 2 nu sunt destinate să descrie sau să caracterizeze, și nu ar trebui să fie utilizate pentru a interpreta înțelesul sau structura componentelor individuale de proteine de fuziune din prezenta invenție.

- 55 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X_4 sau X_5 din SEQ ID NO:1, și cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 din SEQ ID NO:1.

- 60 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin două modificări din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 din SEQ ID NO:1.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1 în care X₆-X₉ sunt fiecare G.

5 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ și X₅ din SEQ ID NO:1.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H.

10 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificarea din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la fiecare din pozițiile X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și X₆-X₉ sunt fiecare G.

15 În anumite realizări, analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

În anumite realizări, analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

În anumite realizări, analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

20 În anumite realizări, analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care X₃ este N și în care X₄ este un aminoacid altul decât G, N, S, V L sau P.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ sau X₅ din SEQ ID NO:1, și cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, sau X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

25 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin două modificări din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, sau X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

30 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

35 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:1 în care X₆-X₉ sunt fiecare G; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

40 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ și X₅ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

45 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

50 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificarea din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la fiecare din pozițiile X₄, X₈, X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

55 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și X₆-X₉ sunt fiecare G; și analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X₁ sau X₂ din SEQ ID NO:2.

60 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ sau X₅ din SEQ ID NO:1, și cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, sau X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin două modificări din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, sau X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

5 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

10 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:1 în care X₆-X₉ sunt fiecare G; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

15 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ și X₅ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

20 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificarea din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la fiecare din pozițiile X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

25 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și X₆-X₉ sunt fiecare G; și analogul catenei A de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la ambele X₁ și X₂ din SEQ ID NO:2.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ sau X₅ din SEQ ID NO:1, și cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, sau X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

35 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include cel puțin două modificări din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, sau X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

40 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:1 în care X₆-X₉ sunt fiecare G; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2 în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

45 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificările din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄ și X₅ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

55 În anumite realizări, analogul catenei B de insulină include modificarea din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la fiecare din pozițiile X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, și X₉ din SEQ ID NO:1; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

În anumite realizări, analogul catenei B de insulină are secvența din SEQ ID NO:1, în care: X₁ este F; X₂ este V; X₃ este N sau D; X₄ este E; X₅ este H; și X₆-X₉ sunt fiecare G; și analogul catenei A de insulină are secvența din SEQ ID NO:2, în care: X₁ este I sau T; X₂ este D; X₃ este G; și X₄ este absent.

În anumite realizări, primul agent de legătură peptidic (Z_2) cuprinde secvența de aminoacizi: X_1GX_2GGGG , în care X_1 este G sau este absent; și X_2 este G, S sau este absent (SEQ ID NO:3).

În anumite realizări, agonistul receptorului pentru insulină, *adică*, $Z_1-Z_2-Z_3$ în proteina de fuziune descrisă mai sus, cuprinde secvența de aminoacizi: $X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFXYX_6X_7X_8X_9X_{10}GX_{11}GGGGGIVEQCCTSX_{12}CSLX_{13}QLENYCX_{14}X_{15}$ în care X_1 este F, Q sau A; X_2 este V sau G; X_3 este N, K, D, G, Q, A sau E; X_4 este E, Y, Q, sau H; X_5 este H sau F; X_6 este G, T, S, H, V sau este absent; X_7 este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X_8 este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X_9 este G, T, S, E, K, A sau este absent; X_{10} este G sau este absent; X_{11} este G, S sau este absent; X_{12} este T sau I; X_{13} este D, Y, Q sau E; X_{14} este G, N, S sau A; și X_{15} este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că atunci cel puțin unul dintre X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 trebuie să fie un aminoacid diferit decât cel găsit, respectiv, la pozițiile B_{16} , B_{25} , B_{27} , B_{28} , B_{29} sau B_{30} ale catenei B a unei molecule de insulină umană, și în plus cu condiția că dacă X_{14} este N, atunci X_{15} trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N (SEQ ID NO:4).

În anumite realizări preferate, antagonistul receptor pentru insulină, *adică*, $Z_1-Z_2-Z_3$ în proteina de fuziune descrisă mai sus are următoarea secvență de aminoacizi: $FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG$ (SEQ ID NO:5).

În proteinele de fuziune din prezenta invenție, al doilea agent de legătură peptidic este o peptidă care are între 10 și 25 aminoacizi, în care cel puțin 50% din respectivii aminoacizi sunt reziduuri G. În anumite realizări, al doilea agent de legătură peptidic este o peptidă care cuprinde secvența de aminoacizi $[GGGGX]_n$, în care X este Q, E sau S; și în care n este 2-5. În anumite realizări, al doilea agent de legătură peptidic cuprinde secvența de aminoacizi: $GGGGX_1GGGGX_2GGGGX_3GGGGX_4X_5X_6$ în care X_1 este Q sau E; X_2 este Q sau E; X_3 este Q sau E; X_4 este G, E, Q sau este absent; X_5 este G sau absent; și X_6 este G sau este absent (SEQ ID NO:6).

În anumite realizări preferate, al doilea agent de legătură peptidic are secvența de aminoacizi: $GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG$ (SEQ ID NO:7).

În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană cuprinde fragmente dintr-un lanț greu al unui anticorp IgG. O diagramă schematică a unei proteine de fuziune care cuprinde o astfel de regiune IgG este prevăzută în diagrama (A) din Figura 2. În alte realizări, regiunea IgG Fc umană cuprinde fragmente din două lanțuri grele ale unui anticorp IgG. O diagramă schematică a unei proteine de fuziune care cuprinde o astfel de regiune IgG este prevăzută în diagrama (B) din Figura 2.

În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană este o regiune Fc de la un anticorp IgG1, IgG2 sau IgG4.

În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană este o regiune Fc de la un anticorp IgG1 care cuprinde următoarea secvență de aminoacizi:

CPPCPAPELLGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVKFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEQYX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGX₆

în care X_1 este F, Q sau E; X_2 este F, Q sau E; X_3 este V sau T; X_4 este V sau T; X_5 este N, D sau Q; și X_6 este K sau este absent. (SEQ ID NO:8)

În anumite realizări, regiunea IgG Fc cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:8 și cuprinde în plus unii sau toți aminoacizii care ar fi găsiți într-o secvență IgG1 Fc de tip sălbatic la partea N-terminală a rezidului C la poziția 1 în SEQ ID NO:8.

Preferabil, regiunea IgG Fc umană este fie dintr-un anticorp IgG2, fie dintr-un anticorp IgG4.

În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană este o regiune Fc de la un anticorp IgG4 care cuprinde următoarea secvență de aminoacizi:

PCPPCPAPEAAGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSX₆LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEALHNHYTQ
KSLSLSLGX₇

in care X₁ este F, Q sau E; X₂ F, Q sau E; X₃ este V sau T; X₄ este V sau T; X₅ este N, D sau Q; X₆ este R, sau K; X₇ este K sau este absent. (SEQ ID NO:9)

- 5 În anumite realizări, regiunea IgG Fc cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:9, și cuprinde în plus unii sau toți aminoacizii care ar fi găsiți în secvența IgG4 Fc de tip sălbatic la partea N-terminală a reziduiului C la poziția 1 în SEQ ID NO:9. În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:9, în care X₁ este F; X₂ este F; X₃ este V; X₄ este V; X₅ este N; X₆ este R; și X₇ este absent.

- 10 În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană este o regiune Fc de la un anticorp IgG2 având următoarea secvență de aminoacizi:

ECPPCPAPPVAGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA
PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHLEALHNHYTQK
SLSLSPGX₆

in care X₁ este F, Q sau E; X₂ este F, Q sau E; X₃ este V sau T; X₄ este V sau T; X₅ este N, D sau Q; și X₆ este K sau absent. (SEQ ID NO: 10)

- 15 În anumite realizări, regiunea IgG Fc cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 10, și cuprinde în plus unii sau toți aminoacizii care ar fi găsiți în secvența IgG2 Fc de tip sălbatic la partea N-terminală a reziduiului E la poziția 1 în SEQ ID NO:10. În anumite realizări, regiunea IgG Fc umană cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:10, in care X₁ este F; X₂ este F; X₃ este V; X₄ este V; X₅ este N; și X₆ este absent.

În anumite realizări, proteina de fuziune cuprinde secvența de aminoacizi:

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁GGGGGIVEQCCTSX₁₂CSL
X₁₃QLENYCX₁₄X₁₅GGGGX₁₆GGGGX₁₇GGGGX₁₈GGGGX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂CPPPCPAPX₂₃X₂₄AGX
25PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSX₂₆EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTX₂₇RVVSVLTVX₂₈HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPXX₂₉X₃₀IEKTISKX₃₁KGQPREPQ
VYTLPPSX₃₂EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPX₃₃LDSDGSF

- 20 FLYSX₃₄LTVDKSRWQX₃₅GNVFSCSVMHLEALHNHYTQKSLSLSX₃₆G
in care X₁ este F, Q sau A; X₂ este V sau G; X₃ este N, K, D, G, Q, A sau E; X₄ este E, Y, Q, sau H; X₅ este H sau F; X₆ este G, T, S, H, V sau este absent; X₇ este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X₈ este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X₉ este G, T, S, E, K, A sau este absent, cu condiția că atunci cel puțin unul dintre X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, sau X₉ este un aminoacid altul decât cel care este prezent, respectiv, în pozițiile B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ sau B₃₀ dintr-o catenă B de insulină umană; X₁₀ este G sau este absent; X₁₁ este G, S sau este absent; X₁₂ este T sau I; X₁₃ este D, Y, Q sau E; X₁₄ este G, N, S sau A; X₁₅ este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că dacă X₁₄ este N, atunci X₁₅ trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N; X₁₆ este Q sau E; X₁₇ este Q sau E; X₁₈ este Q sau E; X₁₉ este G, E, Q sau este absent; X₂₀ este G sau absent; X₂₁ este G sau este absent; X₂₂ este E sau P; X₂₃ este E sau P; X₂₄ este A sau V; X₂₅ este G sau este absent; X₂₆ este Q sau H; X₂₇ este Y sau F; X₂₈ este L sau V; X₂₉ este S sau A; X₃₀ este S sau P; X₃₁ este A sau T; X₃₂ este Q sau R; X₃₃ este V sau M; X₃₄ este R sau K; X₃₅ este E sau Q; și X₃₆ este L sau P (SEQ ID NO:11).

- 35 În anumite realizări, prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune selectată din grupul constând din SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, și SEQ ID NO:24.

Intr-o realizare preferată, proteina de fuziune are secvența de aminoacizi:

```

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

```

(SEQ ID NO:12).

În anumite realizări, proteinele de fuziune din prezenta invenție sunt prezente sub forma unui dimer. O diagramă schematică a unui astfel de dimer este prevăzută în diagrama (C) din Figura 2. În anumite realizări, dimerul este un homodimer, în care secvențele de aminoacizi ale celor două proteine de fuziune care formează dimerul sunt aceleași. În anumite realizări, dimerul este un heterodimer, în care secvențele de aminoacizi ale celor două proteine de fuziune care formează dimerul sunt diferite.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică din prezenta invenție cuprinde o proteină de fuziune din prezenta invenție, un agent de tamponare, un surfactant, și un agent de izotonicitate. În anumite realizări, agentul de tamponare este acidul citric și/sau citratul, surfactantul este polisorbatul 80, și agentul de izotonicitate este manitolul. În anumite realizări, pH-ul compoziției variază de la aproximativ 5,5 până la aproximativ 8,0. În anumite realizări, pH-ul variază de la aproximativ 6,0 până la aproximativ 7,4. În anumite realizări, pH-ul variază de la aproximativ 6,0 până la 6,75.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde în plus un ingredient activ suplimentar. În anumite realizări, ingredientul activ suplimentar este o terapie pe bază de incretin. În anumite realizări preferate, terapia pe bază de incretin este un agonist GLP-1R. Preferabil, agonistul GLP-1R este dulaglutidă.

În anumite realizări, utilizarea terapeutică din prezenta invenție cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-o proteină de fuziune o dată pe zi. În realizările preferate, o cantitate eficientă terapeutic de proteina de fuziune este administrată o dată pe săptămână. În anumite realizări, o cantitate eficientă terapeutic de proteină de fuziune este administrată o dată pe lună. În anumite realizări, prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratarea diabetului zaharat în timp ce reduce riscul de hipoglicemie și/sau câștig în greutate.

Prezenta invenție furnizează de asemenea o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratarea diabetului zaharat, obezității, dislipidemiei, și/sau sindromului metabolic în combinație cu un ingredient activ suplimentar. Proteina de fuziune și ingredientul activ suplimentar în astfel de realizări pot fi administrate simultan, secvențial sau într-o singură formulare combinată. În anumite realizări, ingredientul activ suplimentar este o terapie pe bază de incretin. În anumite realizări preferate, terapia pe bază de incretin este un agonist GLP-1R. Preferabil, agonistul GLP-1R este dulaglutidă. În anumite realizări, combinația este administrată o dată zilnic. În anumite realizări preferate, combinația este administrată o dată săptămânal. În anumite realizări, combinația este administrată o dată lunar.

În anumite realizări, prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul diabetului zaharat, obezității, dislipidemiei sau sindromului metabolic. În anumite realizări, prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei afecțiuni asociate cu diabetul selectată din grupul care constă din boli de inimă, accident vascular cerebral, nefropatie, retinopatie, și boli renale. În anumite realizări, prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune din prezenta invenție pentru utilizare în tratarea unui pacient cu diabet zaharat în timp ce reduce riscul de hipoglicemie și/sau câștig în greutate, cuprinzând administrarea la pacient a unei proteine de fuziune din prezenta invenție. În anumite realizări, proteina de fuziune din prezenta invenție este prevăzută pentru utilizare simultană, separată sau în combinație secvențială cu un alt ingredient activ. În anumite realizări, ingredientul activ suplimentar este o terapie pe bază de incretin. În anumite realizări preferate, terapia pe bază de incretin este un agonist GLP-1R.

În anumite realizări, prezenta invenție furnizează utilizarea unei proteine de fuziune din prezenta invenție în fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului zaharat, obezității, dislipidemiei sau sindromului metabolic. În anumite realizări, prezenta invenție furnizează

utilizarea unei proteine de fuziune din prezenta invenție în fabricarea unui medicament pentru tratamentul sau prevenirea unei afecțiuni asociate diabetului selectată din grupul care constă din boli de inimă, accident vascular cerebral, nefropatie, retinopatie, și boli renale. În anumite realizări, prezenta invenție furnizează utilizarea unei proteine de fuziune din prezenta invenție în fabricarea unui medicament pentru tratarea diabetului zaharat în timp ce reduce riscul de hipoglicemie și/sau câștig în greutate, cuprinzând administrarea la pacient a unei proteine de fuziune din prezenta invenție. În anumite realizări, prezenta invenție furnizează utilizarea unei proteine de fuziune din prezenta invenție în fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului zaharat, obezității, dislipidemiei sau sindromului metabolic, în care medicamentul este pentru administrarea simultană, separată sau secvențială în combinație cu un alt ingredient activ.

Când s-a utilizat aici, termenul „agonist receptor pentru insulină” s-a referit la o proteină care se leagă la și activează receptorul pentru insulină, conducând la o scădere a nivelurilor de glucoză în sânge și/sau la o supresie a producției de glucoză hepatică, caracteristici care pot fi testate și măsurate utilizând tehnici cunoscute, cum ar fi cele prezentate în studiile descrise mai jos.

Porțiunea de agonist receptor pentru insulină a proteinelor de fuziune din prezenta invenție include un analog al unei catene B de insulină și un analog al unei catene A de insulină. Când s-au utilizat aici, termenii „catenă A de insulină” și „catenă B de insulină” se referă la catenele A și B ale moleculei de insulină umană (CAS nr. 11061-68-0), ale căror secvențe native de tip sălbatic sunt bine cunoscute. Catena A de insulină umană constă din 21 de aminoacizi, la care se face referire în domeniu ca A₁-A₂₁, având următoarea secvență: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO:13).

Catena B de insulină umană constă din 30 de aminoacizi, la care se face referire în domeniu ca B₁-B₃₀, având următoarea secvență:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYIPKT (SEQ ID NO:14).

Intr-o moleculă de insulină umană, catenele A și B sunt unite prin două legături disulfură, CisA7-CisB7 și CisA20-CisB19. Catena A are o legătură disulfură intra-catenară la CisA6-CisA11.

Pentru a obține profilul de acțiune dorit extins în timp, agonistul receptor pentru insulină al proteinei de fuziune din prezenta invenție trebuie să rămână în circulație, și să fie capabil să interacționeze cu receptorul pentru insulină, pe o perioadă de timp extinsă. Pentru ca proteinele de fuziune din prezenta invenție să rămână în circulație pe o perioadă dorită de timp, eliminarea proteinelor de fuziune trebuie să fie atenuată. Cele două căi primare de eliminare a insulinei sunt eliberarea renală și eliberarea mediată de receptorul pentru insulină. *Vezi Iglesias P, și colab. Diabet Obes. Metab. 2008;10:811-823.* Pentru a minimiza eliberarea renală, este necesară o moleculă cu dimensiune hidrodinamică de cel puțin aproximativ dimensiunea albuminei din serul uman, și o astfel de dimensiune hidrodinamică este prevăzută în fuziunile de proteine din prezenta invenție prin regiunea IgG Fc umană. Ca și pentru eliberarea mediată de receptor, proteina de fuziune nu poate fi atât de potentă la receptorul pentru insulină astfel încât să conducă la eliberarea mai rapidă mediată de receptor decât cea dorită, dar proteina de fuziune trebuie să fie suficient de potentă totuși, pentru a furniza un control suficient al glucozei la doze care sunt realizabile comercial. Astfel, potența proteinei de fuziune trebuie să fie echilibrată cu grijă, și structura proteinei de fuziune din prezenta invenție trebuie să permită obținerea unui astfel de echilibru.

Moleculele de insulină au o tendință de a se autoasocia în dimeri și hexameri. Au fost propuse numeroase roluri pentru tendințele de conservare evoluționară, de autoasociere ale insulinei, incluzând: (1) stabilizarea chimică și termică a moleculei în timpul depozitării vacuolelor intracelulare; (2) protecția insulinei monomerice de fibrilația in vivo; (3) substituție pentru stabilizarea asistată de haperone și pliere în timpul exprimării intracelulare; și/sau (4) esențial pentru traficul secretor. Forma activă de insulină totuși, este monomerul.

Tendința moleculelor de insulină de a se autoasocia, și inactivitatea unor astfel de molecule autoasociate, este relevantă pentru prezenta invenție, deoarece regiunile IgG Fc umane tind de asemenea să se autoasocieze pentru a forma dimeri, de obicei asociați covalent prin legături disulfură în regiunea balama, și astfel de dimeri sunt formați din regiunile IgG Fc umane în proteinele de fuziune din prezenta invenție. Ca rezultat al dimerizării regiunilor IgG Fc umane, cele două „brațe” ale agoniștilor receptori pentru insulină sunt în strânsă proximitate unul cu celălalt, și prin urmare există la o concentrație locală relativ ridicată. În cazul insulinei umane, o astfel de strânsă proximitate ar tinde să favorizeze autoasocierea, sau dimerizarea radicalilor de insulină, afectând activitatea moleculei. O diagramă schematică a unui dimer proteic de fuziune Fc cu brațele radicalului de insulină care au devenit autoasociate, sau dimerizate, este prevăzută în diagrama (D) din Figura 2. Tendința moleculelor de insulină de a se autoasocia ar putea de asemenea conduce la autoasociere, sau dimerizare, a radicalilor de insulină de mai mult de un

dimer proteic de fuziune Fc; o diagramă schematică a unui dimer din doi dimeri proteici de fuziune Fc cu radicali de insulină autoasociați, sau dimerizați este prevăzută în diagrama (E) din Figura 2. În plus, radicalii de insulină în mai mult de doi dimeri proteici de fuziune Fc ar putea de asemenea să se autoasocieze într-o astfel de manieră pentru a forma, de exemplu, un trimer care cuprinde trei dimeri, sau chiar agregate de ordin mai ridicat care sunt compuse din mai mult de trei dimeri.

Porțiunea de agonist receptor pentru insulină a proteinei de fuziune din prezenta invenție are totuși, o tendință redusă de a se autoasocia sau dimeriza, și astfel dimerii proteici de fuziune cuprinși ai proteinelor de fuziune din prezenta invenție tind să favorizeze structura reprezentată în diagrama (C) din Figura 2, spre deosebire de structurile reprezentate în diagramele (D) și (E) din Figura 2. Astfel, în timp ce prezenta invenție furnizează un dimer a două proteine de fuziune, „brațul” agonistului receptor pentru insulină al fiecărei proteine de fuziune în dimer, menține o stare predominant monomerică, cum s-a reprezentat de exemplu în diagrama (C) din Figura 1, și este astfel mai capabil să interacționeze cu receptorul pentru insulină.

În proteinele de fuziune din prezenta invenție, analogul catenei B de insulină în agonistul receptor pentru insulină include una sau mai multe modificări la secvența de aminoacizi a catenei B de insulină umană. În particular, pentru a reduce predilecția porțiunilor de agonist receptor al insulinei de a se autoasocia, sau dimeriza, analogul catenei B de insulină include una sau mai multe modificări din catena B a unei molecule de insulină umană la pozițiile B₁₆, B₂₅ sau B₂₇₋₃₀, care sunt reprezentate în SEQ ID NO:1 ca pozițiile X₄, X₅ și respectiv X₆₋₉. De exemplu: X₄ (care corespunde cu B₁₆ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) poate fi modificat la E, Q sau H; X₅ (care corespunde cu B₂₅ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) poate fi modificat la H; X₆ (care corespunde cu B₂₇ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) poate fi șters sau modificat la G, S, H sau V; X₇ (care corespunde cu B₂₃ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) poate fi șters sau modificat la G, E, K, D, S sau H; X₈ (care corespunde cu B₂₉ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) poate fi șters sau modificat la G, E, P, Q, D sau H; și X₉ (care corespunde cu B₃₀ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) poate fi șters sau modificat la G, S, E sau K. În plus pentru o reducere a predilecției porțiunilor de agonisti receptori ai insulinei de a se autoasocia, modificările la pozițiile B₁₆ și B₂₅ pe analogii - X₄ și respectiv X₅ ai catenei B de insulină din SEQ ID NO:1 - pot fi de asemenea făcute pentru ajustarea potenței, îmbunătățirea exprimării, îmbunătățirea stabilității chimice și/sau fizice, îmbunătățirea ușurinței cu care proteinele de fuziune poate fi formulate cu alți excipienți utilizați în mod obișnuit și/sau pentru a elimina deamidarea. Analogul catenei B de insulină poate include de asemenea modificări suplimentare din aceste motive. Referindu-ne la variabilele din SEQ ID NO:1, astfel de modificări suplimentare includ următoarele: modificarea lui X₁ (care corespunde cu B₁ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) la Q sau A; modificarea lui X₂ (care corespunde cu B₂ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) la G; și/sau modificarea lui X₃ (care corespunde cu B₃ în catena B dintr-o moleculă de insulină umană) la K, D sau G.

În anumite realizări preferate, analogul catenei B de insulină include mai mult de o modificare la secvența de aminoacizi a catenei B de insulină umană în pozițiile X₄, X₅ și X₆₋₉ din SEQ ID NO:1. Într-o realizare preferată, X₄ este E și X₅ este H. În anumite realizări, secvența de aminoacizi de X₆₋₉ din SEQ ID NO:1 este selectată din grupul care constă din: 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, TGGG, TPGG, EPKT, TDKT, TPGS, OUĂ, EGES, EEES, EPES, EPEP și GGDD. În realizările preferate, secvența de acești patru aminoacizi este GGGs, GGGG sau TEET. În realizări în special preferate, X₄ este E, X₅ este H și X₆₋₉ este GGGG.

Ar trebui să se observe că, în timp ce X₆₋₉ din SEQ ID NO:1 sunt descriși mai sus ca cuprinzând capătul C-terminal al analogului catenei B de insulină (Z₁), acești aminoacizi nu sunt critici la activitatea proteinelor de fuziune la receptorul pentru insulină, și astfel pot fi considerați alternativ o extensie a primului agent de legătură peptidic (Z₂). De exemplu, în contextul din SEQ ID NO:4, X₆₋₉ poate fi considerată parte fie a analogului catenei B de insulină, fie a primului agent de legătură peptidic în acel agonist receptor pentru insulină.

În proteinele de fuziune din prezenta invenție, analogul catenei A de insulină în porțiunea agonistului receptor pentru insulină poate include una sau mai multe modificări la secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană destinată a îmbunătăți stabilitatea chimică și fizică, a ajusta potența, și/sau a intensifica exprimarea. Referindu-ne la variabilele din SEQ ID NO:2, aceste modificări includ următoarele: modificarea lui X₁ (care corespunde cu A₁₀ în catena A dintr-o moleculă de insulină umană) la T; modificarea lui X₂ (care corespunde cu A₁₄ în catena A dintr-o moleculă de insulină umană) la D, Q sau E; și/sau modificarea lui X₃ (care corespunde cu A₂₁ în

catena A dintr-o moleculă de insulină umană) la G, S sau A. Într-o realizare preferată, X_1 este T, X_2 este D, și X_3 este G.

În plus, pentru a evita deamidarea precum și clivarea chimică și/sau proteolitică, dacă aminoacidul la poziția 21 în analogul catenei A de insulină în agonistul receptor pentru insulină, *adică*, X_3 în SEQ ID NO:2, este un N - aminoacid care este prezent la poziția corespunzătoare dintr-o moleculă de insulină umană - ar trebuie să nu fie urmat imediat la partea C-terminală de anumiți aminoacizi, cum ar fi un G sau un N, sau, în anumite realizări, un P, S, V sau L. *Vezi, de exemplu*, Vlasak J, Ionescu R., MAbs. 2011 mai-iunie;3(3):253-63. *Fragmentation of Monoclonal Antibodies*. Ar trebui să se observe că în timp ce această cerință este relatată în prima proteină de fuziune descrisă mai sus în contextul opțiunilor pentru pozițiile X_4 și X_5 în SEQ ID NO:2, care se referă la analogul catenei A de insulină, nu este critică pentru reziduurile non-glicină după un reziduu de asparagină la poziția 21 în analogul catenei A de insulină pentru a fi considerat parte a agonistului receptor pentru insulină, spre deosebire de al doilea agent de legătură peptidic. De exemplu, în contextul din SEQ ID NO:11, reziduu corespunzător poziției 21 în porțiunea analogă a catenei A este reprezentat de X_{14} , și următorul aminoacid, X_{15} , ar putea fi considerat fie parte a agonistului receptor al insulinei, fie a celui de al doilea agent de legătură peptidic.

Cum s-a descris mai sus, în proteinele de fuziune din prezenta invenție, reziduu C-terminal al analogului catenei B de insulină este direct fuzionat la reziduu N-terminal al unui prim agent de legătură peptidic și reziduu C-terminal al primului agent de legătură peptidic este direct fuzionat la reziduu N-terminal al analogului catenei B de insulină. Primul agent de legătură peptidic trebuie să asigure suficientă flexibilitate pentru analogii catenei A și catenei B de insulină pentru a obține structura necesară pentru a se lega la receptorul pentru insulină, dar nu trebuie să fie atât de lung încât să interfereze excesiv cu acea legătură. Lungimea și compoziția primului agent de legătură peptidic poate fi ajustată pentru a ajustea potența și/sau exprimarea proteinelor de fuziune. În unele realizări, primul agent de legătură peptidic este de 5 până la 10 aminoacizi în lungime, din care cel puțin 5 sunt reziduuri G. În anumite realizări, secvența de aminoacizi a primului agent de legătură peptidic este selectată din grupul care constă din: GGGGGG, GGGGG, EGGGGG, GEGGGG, GEGGG, GGEGG, GGGGEG, GGGGGE, KGGGGG, GKGGGG, GGKGGG, GGGKGG, GGGGKG, GGGGGK, HGGGGG, GHGGGG, GGHGGG, GGGHGG, GGGGHG, GGGGGH, GGGGGA, GGGGGR, SGGGGG, GSGGGG, GGSGGG, GGSGGGK, GGSGGG și GGSGGG. În anumite realizări preferate, secvența primului agent de legătură peptidic cuprinde SEQ ID NO:3. Cel mai preferabil, secvența primului agent de legătură peptidic este GGSGGGG (SEQ ID NO:15). Porțiunea agonistului receptor pentru insulină al proteinelor de fuziune din prezenta invenție include de asemenea legăturile disulfură găsite într-o moleculă de insulină umană cum s-a descris mai sus, și anume, două legături disulfură care unesc analogii catenei A și catenei B de insulină la CisA7-CisB7 și CisA20-CisB19, și o legătură disulfură intracatenară în analogul catenei A de insulină la CisA6-CisA11.

Cum s-a descris mai sus, reziduu C-terminal al porțiunii de agonist receptor al insulinei proteinelor de fuziune din prezenta invenție este fuzionat la reziduu N-terminal al unui al doilea agent de legătură peptidic, și reziduu C-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic este fuzionat direct la reziduu N-terminal al porțiunii Fc. Este preferat ca al doilea agent de legătură peptidic să fie bogat în glicină, pentru a furniza suficientă flexibilitate conformațională. Al doilea agent de legătură peptidic este între 10 și 25 de aminoacizi în lungime, cu cel puțin 50% din aminoacizi fiind reziduuri de glicină. Un al doilea agent de legătură peptidic preferat include secvența $(GGGGX_{15})_n$ în care X_{15} este Q, E sau S și $n = 2-5$. Un al doilea agent de legătură peptidic mai preferat are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:6. Cel mai preferat al doilea agent de legătură peptidic are secvența de aminoacizi GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO:7).

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „regiunea IgG Fc umană” are înțelesul dat în mod obișnuit de termen în domeniul imunologiei. Specific, acest termen se referă la un fragment de anticorp IgG uman care este obținut prin îndepărtarea cele două regiuni de legare la antigen (fragmente Fab) de anticorp. În particular, regiunea Fc include domeniile regiunilor constante CH2 și CH3 ale anticorpului, și poate include de asemenea unele sau toate regiunile balama.

Cum s-a descris mai sus, în anumite realizări ale proteinei de fuziune din prezenta invenție, regiunea IgG Fc umană cuprinde fragmente ale regiunii constante dintr-un lanț greu al unui anticorp IgG, a cărei descriere schematică este furnizată în diagrama (A) din Figura 2, și în alte realizări, regiunea IgG Fc umană cuprinde fragmente ale regiunilor constante din două lanțuri grele ale unui anticorp IgG, a cărei descriere schematică este furnizată în diagrama (B) din Figura

2. În această realizare, regiunile constante ale celor două lanțuri grele sunt asociate unele cu altele prin interacțiuni non-covalente și legături disulfură.

Există patru subclase de IgG (G1, G2, G3, și G4) din care fiecare are structuri și funcții biologice diferite cunoscute ca funcții efectoare. Aceste funcții efectoare sunt în general mediate prin interacțiunea cu receptorul Fc (FcγR) sau prin legarea factorului complementar C1q. Legarea la FcγR poate conduce la citolize mediate de celule dependente de anticorp, în timp ce legarea la factorii complementari poate conduce la o lizare celulară mediată de complement. Structurile și proprietățile regiunilor Fc ale subclaselor de IgG sunt cunoscute în domeniu. Proteinele de fuziune din prezenta invenție pot conține regiuni Fc din oricare din subclasele de IgG, deși G2 și G4 și au activități de legare la receptor și activități ale funcțiilor efectoare mai scăzute decât ale anticorpilor G1 și G3, și sunt astfel preferați.

Când s-a utilizat aici, termenul regiune IgG Fc umană include de asemenea versiuni ale unor astfel de fragmente de anticorp care au fost modificate, alungite și/sau trunchiate, de exemplu, pentru a altera proprietățile sau caracteristicile cum ar fi funcțiile de legare la complement și/sau la receptorul Fc, funcțiile efectoare, formarea legăturii disulfură, glicozilarea, citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorp (ADCC), manufacturabilitatea, și/sau stabilitatea. De exemplu, regiunile IgG Fc umane ale proteinelor de fuziune din prezenta invenție pot fi modificate pentru a reduce sau îndepărta situsurile de glicozilare legate N, care vor reduce afinitatea și citotoxicitate de legare la C1q, și care ar putea ajuta la imunogenicitate, afectarea stabilității conformaționale și rata de eliberare in vivo, și/sau modificarea funcțiilor efectoare. Regiunile IgG Fc umane ale proteinelor de fuziune din prezenta invenție pot avea de asemenea unele sau toate regiunile balama îndepărtate pentru a simplifica dimerizarea Fc mediată de disulfură. Alte exemple de alterări includ fosforilarea, sulfatarea, acilarea, glicozilarea, metilarea, acetilarea, amidarea, și/sau modificările pentru a permite producția de molecule heterodimere. Tehnicile pentru modificarea structurilor și proprietăților regiunilor IgG Fc umane ale subclaselor de IgG sunt cunoscute în domeniu.

Indiferent de structura finală a proteinei de fuziune, regiunea IgG Fc umană trebuie să servească la prelungirea perioadei de înjumătățire a plasmiei in vivo a agonistului receptor pentru insulină. În prepararea proteinelor de fuziune Fc heterologe în care porțiunea Fc este utilizată pentru abilitatea sa de a extinde perioada de înjumătățire, este important să se minimizeze orice funcții efectoare. Mai mult, agonistul receptor fuzionat pentru insulină trebuie să rămână capabil să se lege la și să activeze receptorul pentru insulină pentru a conduce la o scădere a nivelurilor de glucoză în sânge și/sau la o supresie a producției de glucoză hepatică, caracteristici care pot fi testate și măsurate utilizând tehnici cunoscute, cum ar fi cele prezentate în studiile descrise mai jos. O perioadă de înjumătățire lungă a proteinelor de fuziune din prezenta invenție poate fi demonstrată utilizând, de exemplu, metodele descrise mai jos.

O regiune IgG Fc umană preferată este o regiune IgG4 Fc modificată pentru a reduce suplimentar funcțiile efectoare, pentru a promova formarea de homodimeri, și a avea o porțiune din balama ștearsă, ca în SEQ ID NO:9 în care X₁ este F; X₂ este F; X₃ este V; X₄ este V; X₅ este N; X₆ este R; și X₇ este absent.

O altă regiune IgG Fc umană preferată este o regiune IgG2 Fc care are o porțiune din balama ștearsă, ca în SEQ ID NO:10 în care X₁ este F; X₂ este F; X₃ este V; X₄ este V; X₅ este N; și X₆ este absent.

Ar trebui să se observe că, deși secvențele de aminoacizi ale regiunilor IgG Fc umane preferate relatate mai sus au porțiuni de regiuni balama îndepărtate pentru a simplifica dimerizarea mediată de disulfură, acele regiuni balama pot fi prezente în anumite realizări. De exemplu, o regiune IgG2 Fc de tip sălbatic include cele șase secvențe de aminoacizi ERKCCV la capătul său N-terminal, și deși acești aminoacizi nu sunt relați în secvența regiunii IgG2 Fc stabilită în SEQ ID NO:10, se are în vedere că o regiune IgG Fc umană care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SEQ ID NO:10 poate cuprinde suplimentar unele sau toate din cele șase secvențe de aminoacizi ERKCCV la capătul său N-terminal. În mod similar, o regiune IgG Fc umană care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SEQ ID NO:9 poate cuprinde suplimentar unii sau toți din cei șase aminoacizi găsiți la capătul N-terminal al unei regiuni IgG4 Fc, și anume ESKYGP. În mod asemănător, o regiune IgG Fc umană care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SEQ ID NO:8 poate cuprinde suplimentar unii sau toți din cei zece aminoacizi găsiți la capătul N-terminal al unei regiuni IgG1 Fc, și anume: EPKSCDKTHT. Mai mult, conturarea precisă între care aminoacid constituie capătul C-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic și care aminoacid constituie capătul N-terminal al regiunii IgG Fc umane nu este critică pentru structura sau funcționarea proteinei de fuziune din prezenta invenție. De exemplu, în contextul din SEQ ID NO:11, reziduurile corespunzătoare pozițiilor X₁₉-X₂₂ ar putea fi descrise ca fiind capătul C-

terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic sau o extensie a N-terminalului regiunii IgG Fc umane.

Cum s-a descris mai sus, prezenta invenție se referă de asemenea la polinucleotidele care codifică oricare din proteinele de fuziune din prezenta invenție. Polinucleotidele care codifică

5 proteinele de fuziune descrise mai sus, pot fi în formă de ARN sau ADN, care include ADNc și ADN sintetic, și care pot fi dublu catenare sau monocatenare. Secvențele codificatoare care codifică proteinele din prezenta invenție pot varia ca rezultat al redundanței sau degenerării codului genetic.

Polinucleotidele care codifică proteinele de fuziune din prezenta invenție pot include

10 următoarele: numai secvența codificatoare pentru proteine, secvența codificatoare pentru proteine și secvența codificatoare suplimentară, cum ar fi o secvență lider sau secretoare sau o secvență proproteică; secvența codificatoare pentru secvențele proteice și necodificatoare, cum ar fi intronii sau secvențele necodificatoare 5' și/sau 3' ale secvenței codificatoare pentru proteine. Astfel, termenul „polinucleotidă care codifică o proteină” cuprinde o polinucleotidă care poate include nu

15 numai secvența codificatoare pentru proteine ci și de asemenea o polinucleotidă care include suplimentar secvența codificatoare și/sau necodificatoare.

Polinucleotidele din prezenta invenție vor fi exprimate într-o celulă gazdă după ce secvențele au fost legate operabil la o secvență de control a exprimării. Vectorii de exprimare sunt de obicei replicabili în organismele gazdă fie ca epizomi, fie ca o parte integrală din ADN-ul cromozomial al gazdei. În mod obișnuit, vectorii de exprimare vor conține markeri de selecție

20 pentru a permite detecția acelor celule transformate cu secvențele ADN dorite.

Proteinele de fuziune din prezenta invenție pot fi cu ușurință produse în celule de mamifer cum ar fi CHO, NSO, HEK293, BHK, sau celule COS; în celulele bacteriene cum ar fi *E. coli*, *Bacillus subtilis*, sau *Pseudomonas fluorescență*; în celule de insecte, sau în celule de ciuperci

25 sau de drojdie, care sunt cultivate utilizând tehnici cunoscute în domeniu. Insectele, și drojdia sau alte celule de ciuperci, produc totuși, N-glicani neumani, astfel încât proteinele cu glicozilare N-legate produse în astfel de celule pot cauza reacții imunogenice dacă sunt administrate pacienților. Producția în astfel de celule necesită astfel eliminarea situsurilor de glicozilare N-legate și/sau modificarea genetică a celulelor pentru a produce N-glicani umani utilizând tehnici cunoscute în

30 domeniu. Vezi, de exemplu, Hamilton SR, și colab., Production of complex human glycoproteins in yeast, 301 SCIENCE (5637): 1244-6 (August 2003). Este preferată producția în celulele de mamifer, și celula gazdă de mamifer preferată este linia celulară CHOK1 SV care conține un sistem de exprimare (GS) al sintetazei de glutamină (vezi US. Pat nr. 5.122.464).

Vectorii care conțin secvențele de polinucleotide de interes (de exemplu, proteinele de

35 fuziune și secvențele de control ale expresiei) pot fi transferați în celula gazdă prin metode bine cunoscute, care variază depinzând de tipul celulei gazdă. De exemplu, transformarea clorurii de calciu este utilizată în mod obișnuit pentru celulele procariote, în timp ce tratamentul sau electroporația fosfatului de calciu poate fi utilizată pentru alte celule gazdă.

Pot fi utilizate diferite metode de purificare a proteinei și astfel de metode sunt cunoscute

40 în domeniu și descrise, de exemplu, în Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83-89 (1990) and Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, ediția a 3-a, Springer, N.Y. (1994).

Cum s-a descris mai sus, proteina de fuziune din prezenta invenție în anumite realizări este produsă ca dimer. Într-un astfel de dimer, regiunile IgG Fc umane ale proteinelor de fuziune sunt asociate una cu alta prin interacțiuni non-covalente și legături disulfură. O descriere

45 schematică a unui astfel de dimer este prevăzută în diagrama (C) din Figura 2. Când secvențele de aminoacizi ale celor două proteine de fuziune care alcătuiesc un astfel de dimer - de exemplu, proteina de fuziune A și proteina de fuziune B în dimerul reprezentat în diagrama (C) din Figura 2 - sunt aceleași, dimerul este referit aici ca „homodimer”. Cum s-a observat mai sus, este preferată exprimarea proteinelor de fuziune din prezenta invenție în celulele de mamifer, și exprimarea în

50 astfel de celule conduce la homodimeri. Proteinele de fuziune în astfel de homodimeri sunt asociate prin interacțiuni non-covalente și legături disulfură intermoleculare în porțiunea Fc. De exemplu, proteina produsă de o genă care codifică proteina de fuziune din SEQ ID NO:12 ar fi un homodimer legat covalent prin legături disulfură intercatenare, și anume C80 până la C80 și C83 până la C83.

Când secvențele de aminoacizi a celor două proteine de fuziune care alcătuiesc un dimer

55 - de exemplu, proteina de fuziune A și proteina de fuziune B în diagrama (C) din Figura 2 - sunt diferite, dimerul este referit aici ca „heterodimer”. Un astfel de heterodimer poate fi preparat prin tehnici cunoscute în domeniu. Vezi, e.g., Lewis SM, și colab. 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).

60

Referirile de aici la compoziții farmaceutice care cuprind o proteină de fuziune includ compoziții farmaceutice care conțin un homodimer din acea proteină de fuziune, și/sau care conțin un heterodimer, în care un membru al heterodimerului este o proteină de fuziune. În mod asemănător, referirile la o proteină de fuziune pentru utilizare în terapie și/sau o proteină de fuziune pentru utilizare în fabricarea unui medicament includ un homodimer din acea proteină de fuziune, și/sau un heterodimer în care un membru al heterodimerului este o proteină de fuziune, pentru utilizare în terapie și/sau în fabricarea unui medicament.

Termenii „tratament” sau „tratare”, așa cum s-au utilizat în acest document, se referă la gestiunea și grija față de un pacient care are diabet sau hiperglicemie, sau altă afecțiune pentru care este indicată administrarea de insulină în scopul combaterii sau atenuării simptomelor și complicațiilor acelor afecțiuni. Tratarea include administrarea proteinelor de fuziune din prezenta invenție pentru a preveni sau întârzia debutul simptomelor sau complicațiilor, atenuarea simptomelor sau complicațiilor, sau eliminarea bolii, afecțiunii, sau tulburării. Pacientul care trebuie tratat este un mamifer, și preferabil, o ființă umană.

Termenii „previne” sau „prevenirea”, așa cum s-au utilizat în acest document, se referă la reducerea riscului sau incidenței de, sau eliminării sau încetinirii progresului, unuia sau mai multor afecțiuni, simptome, complicații sau tulburări.

Proteinele de fuziune din prezenta invenție pot fi utilizate pentru a trata subiecții cu o largă varietate de boli și afecțiuni. Sunt incluși subiecții cu hiperglicemie, cu diabet dependent de insulină precum și subiecți cu diabet nedependent de insulină, incluzând tratamentul subiecților naivi precum și subiecții care sunt tratați cu medicații orale, cum ar fi o sulfoniluree, metformină, tiazolidinedionă cum ar fi pioglitazonă, inhibitorul α -glucosidază cum ar fi acarboza, și/sau injectabilele neinsulinice, incluzând terapiile pe bază de incretin, cum ar fi inhibitorii DPP-4 și agoniștii GLP-1R. Proteinele de fuziune din prezenta invenție pot fi utilizate pentru reglarea glucozei în sânge la astfel de pacienți, și pot trata afecțiunile sau complicațiile care rezultă din controlul insuficient al glucozei în sânge cum ar fi retinopatia, neuropatia sau boala renală.

În anumite realizări, proteina de fuziune din prezenta invenție este administrată în fiecare zi, în fiecare altă zi, de două ori pe săptămână, de trei ori pe săptămână, o dată pe săptămână, de două ori pe lună sau o dată pe lună. În realizările preferate, durata de acțiune este extinsă suficient pentru a permite dozarea o dată pe săptămână. Chiar pentru astfel de molecule care acționează pe termen lung totuși, se va recunoaște de către cei calificați în domeniu că controlul eficient al glucozei poate fi de asemenea furnizat prin acumularea dozală graduală a unui medicament cu un profil farmacocinetic lung utilizând un regim de tratament mai frecvent, cum ar fi o dată zilnic. *Vezi, de exemplu*, Heise T și Meneghini LF, 20 ENDOCR. PRACT. p75-83 (2014).

În anumite realizări, proteina de fuziune din prezenta invenție este administrată în combinație cu un ingredient activ suplimentar, cum ar fi insulina sau un analog al insulinei, o terapie pe bază de incretin, sau o medicație orală pentru diabet, cum ar fi o sulfoniluree, metformină, tiazolidinedionă cum ar fi pioglitazonă sau un inhibitor α -glucosidază cum ar fi acarboza.

Termenul „terapie pe bază de incretin” include orice tratament care cuprinde administrarea de, sau promovarea, permisia, ameliorarea și/sau simularea efectelor, unui grup de hormoni metabolici cunoscuți ca incretini, care grup include GLP-1 și o peptidă inhibitoare gastrică (GIP). Terapiile pe bază de incretin care sunt în prezent disponibile includ inhibitori DPP-4 și agoniști GLP-1R.

Un „inhibitor DPP-4” este un compus care blochează enzima DPP-4, care este responsabilă pentru degradarea incretinilor. Inhibitorii DPP-4 disponibili în prezent includ sitagliptin (Januvia®), și linagliptin (Tradjenta®).

Un „agonist GLP-1R” este definit ca un compus care cuprinde secvența de aminoacizi de GLP-1 uman nativ (SEQ ID NO:25), un analog GLP-1, derivat GLP-1 sau proteină de fuziune GLP-1, care menține activitatea la receptorul GLP-1. Activitatea GLP-1R poate fi măsurată prin metode cunoscute în domeniu, incluzând utilizarea de experimente *in vivo* și teste *in vitro* care măsoară activitatea de legare a receptorului GLP-1 sau activarea receptorului, de exemplu, teste care utilizează celulele islet pancreatice sau celulele insulinome, cum s-a descris în EP 619.322 și respectiv brevetul S.U.A. nr. 5.120.712. Un analog GLP-1 este o moleculă care are o modificare care include una sau mai multe substituții, deleții, inversiuni, sau adăugări de aminoacizi, când se compară cu secvența de aminoacizi a GLP-1 uman nativ (SEQ ID NO:25). Un derivat GLP-1 este o moleculă având secvența de aminoacizi de GLP-1 uman nativ (SEQ ID NO:25) sau a unui analog GLP-1, dar având suplimentar cel puțin o modificare chimică dintr-una sau mai multe din grupările sale laterale aminoacide, atomi α -carbon, grupare amino terminală, sau grupare acid carboxilică terminală. O proteină de fuziune GLP-1 este o proteină heterologă care cuprinde un GLP-1, un analog GLP-1 sau o porțiune derivată GLP-1 și o a doua polipeptidă.

Agoniștii GLP-1R disponibili în prezent includ exenatidele (Byetta® și Bydureon®), liraglutidele (Victoza®), albiglutidele (Tanzeum®) și dulaglutidele (Trulicity®), structuri care sunt cunoscute în domeniu vezi, de exemplu, US 5.424.286 (exenatide); US 6.268.343 (liraglutide); US 2014044717 (albiglutide); și US 7.452.966 (dulaglutide).

În realizările în care o proteină de fuziune din prezenta invenție este prevăzută în combinație cu un ingredient activ suplimentar, proteina de fuziune și ingredientul activ suplimentar pot fi administrate simultan, secvențial sau într-o singură, formulare combinată.

Proteinele de fuziune din prezenta invenție sunt eficiente în tratarea unor astfel de boli și afecțiuni prin administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție. Așa cum s-a utilizat în acest document, exprimarea „cantitate eficientă terapeutic” se referă la acea cantitate dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție, suficientă pentru reglarea glucozei în sânge la un pacient fără să cauzeze efecte secundare inacceptabile. O cantitate eficientă terapeutic de proteină de fuziune administrată la un subiect va depinde de tipul și severitatea bolii și de caracteristicile subiectului, cum ar fi sănătatea generală, vârsta, sexul, greutatea corporală, și toleranța la medicamente. Specialistul calificat va fi capabil să determine dozajul adecvat depinzând de acești și alți factori. În anumite realizări, o cantitate eficientă terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție când este administrată o dată pe săptămână variază de la aproximativ 0,01 nmol/kg până la aproximativ 100 nmol/kg. Mai preferabil, o cantitate eficientă terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție când este administrată o dată pe săptămână variază de la aproximativ 1 nmol/kg până la aproximativ 50 nmol/kg. Mai preferabil, o cantitate eficientă terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție când este administrată o dată pe săptămână variază de la aproximativ 16 nmol/kg până la aproximativ 25 nmol/kg. În anumite realizări, o cantitate eficientă terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție când este administrată o dată pe săptămână variază de la aproximativ 1 mg până la aproximativ 200 mg. Mai preferabil, o cantitate eficientă terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție când este administrată o dată pe săptămână variază de la aproximativ 25 mg până la aproximativ 175 mg. Mai preferabil, o cantitate eficientă terapeutic dintr-o proteină de fuziune din prezenta invenție când este administrată o dată pe săptămână variază de la aproximativ 100 mg până la aproximativ 160 mg.

Persoanele calificate în domeniu vor înțelege că, atunci când proteina de fuziune din prezenta invenție este administrată în combinație cu un alt ingredient activ, cum ar fi un agonist GLP-1R, doza poate fi ajustată astfel încât activitatea celor două tratamente combinate să fie suficientă pentru reglarea glucozei în sânge la un pacient. Astfel, cantitatea de proteină de fuziune care trebuie să fie administrată pentru reglarea nivelurilor de glucoză în sânge în astfel de combinații poate fi mai mică decât cea care ar fi necesară dacă proteina de fuziune ar fi administrată ca monoterapie. De exemplu, când proteina de fuziune din prezenta invenție este prevăzută în combinație cu un agonist GLP-1R, cantitatea de proteină de fuziune care trebuie să fie furnizată într-o doză o dată pe săptămână poate fi redusă cu până la 50%, în comparație cu cantitatea din aceeași proteină de fuziune utilizată ca monoterapie, cum ar fi dozele descrise în paragraful precedent.

Preferabil, administrarea unei cantități eficiente terapeutic de proteină de fuziune din prezenta invenție în unele realizări va furniza controlul eficient al glucozei în timp ce reduce riscul de hipoglicemie și/sau câștig în greutate în comparație cu tratamentele existente. Incidența hipoglicemiei cauzate de o terapie a diabetului care agonizează receptorul pentru insulină poate fi minimizată prin evitarea unui vârf rapid în concentrația de agent terapeutic după administrare. Proteinele de fuziune din prezenta invenție au un profil de acțiune extins în timp, fără un vârf rapid în concentrație după administrare.

Mai mult, în realizările în care proteinele de fuziune din prezenta invenție sunt furnizate în combinație cu un alt ingredient activ, în particular, un agonist GLP-1R, activitatea hepatopreferențială a proteinelor de fuziune din prezenta invenție poate de asemenea reduce riscul de hipoglicemie în timp ce controlează nivelurile de glucoză. Deoarece proteina de fuziune din prezenta invenție poate accesa cu ușurință ficatul prin endoteliul sinusoid fenestrat, molecula poate controla producția de glucoză hepatică, cu o mică, dacă există, activitate la periferie, în timp ce agonistul GLP-1R promovează secreția dependentă de glucoză a insulinei endogene din pancreas, care este cu ușurință capabilă să perfuzeze în periferie pentru a controla absorbția de glucoză în mușchi și grăsime.

Proteinele de fuziune din prezenta invenție sunt administrate parenteral, prin administrare nazală sau inhalare pulmonară. Este preferată administrarea parenterală, și poate include, de exemplu, administrarea sistemică, cum ar fi prin injectare intramusculară, intravenoasă, subcutanată, sau intraperitoneală.

Proteinele de fuziune pot fi administrate subiectului într-o compoziție farmaceutică, care cuprinde o proteină de fuziune din prezenta invenție și cel puțin un excipient acceptabil farmaceutic. Astfel de compoziții farmaceutice sunt de obicei, deși nu în mod necesar, parenterale în natură și pot fi preparate prin oricare dintr-o varietate de tehnici care utilizează excipienți convenționali pentru produse parenterale, care sunt bine cunoscute în domeniu. *Vezi, de exemplu*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, a 21-a ediție, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Cum s-a descris mai sus, proteina de fuziune din prezenta invenție este un homodimer când este exprimată în celulele de mamifer. Astfel, când este utilizat termenul „compoziție care cuprinde o proteină de fuziune” include o compoziție, care conține un homodimer al unei proteine de fuziune. În anumite realizări, o compoziție farmaceutică din prezenta invenție include o compoziție cu proteina de fuziune din prezenta invenție prezentă într-o concentrație de cel puțin 1 mg/mL, cel puțin 2 mg/mL, cel puțin 5 mg/mL, cel puțin 10 mg/mL, cel puțin 20 mg/mL, cel puțin 25 mg/mL, cel puțin 30 mg/mL, cel puțin 35 mg/mL, cel puțin 50 mg/mL, cel puțin 55 mg/mL, cel puțin 60 mg/mL, cel puțin 65 mg/mL, cel puțin 75 mg/mL, cel puțin 100 mg/mL sau mai mare. În realizările preferate, proteina de fuziune este prezentă într-o concentrație de 10-100 mg/mL. În mai multe realizări preferate, proteina de fuziune este prezentă într-o concentrație de 15-75 mg/mL, și în cele mai multe realizări preferate, proteina de fuziune este prezentă într-o concentrație de 20-65 mg/mL.

Termenul „excipient” înseamnă orice substanță adăugată la compoziție, alta decât proteina de fuziune sau orice alt ingredient activ suplimentar. Exemple de astfel de excipienți care pot fi utilizați în compozițiile prezentei invenții includ agenți de tamponare, surfactanți, agenți pentru izotonicitate și conservanți.

În anumite realizări, compoziția din prezenta invenție include unul sau mai mulți agenți de tamponare pentru a controla pH-ul compoziției. Un „agent de tamponare” este o substanță care rezistă modificărilor în pH prin acțiunea componentelor sale conjugate acid-bază. În anumite realizări, compoziția din prezenta invenție are un pH de la aproximativ 5,5 până la aproximativ 8,0, preferabil, între aproximativ 6,0 și aproximativ 7,4, mai preferabil între aproximativ 6,0 și 6,75. Agenții de tamponare adecvați pentru controlarea pH-ului compozițiilor din prezenta invenție în intervalul dorit includ, dar nu se limitează la, agenți cum ar fi fosfatul, acetatul, citratul, sau acizi ai acestuia, arginina, TRIS, și tamponate de histidină, precum și combinații ale acestora. „TRIS” se referă la 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol, și la orice sare acceptabilă farmacologic a acestuia. Baza liberă și forma clorhidrată (adică, TRIS-HCl) sunt două forme comune de TRIS. TRIS este de asemenea cunoscut în domeniu ca trimetilol aminometan, trometamină, și tris(hidroximetil) aminometan. Agenții de tamponare preferați în compoziția din prezenta invenție sunt citratul, sau acidul citric, și fosfatul.

În anumite realizări, compozițiile prezentei invenții includ unul sau mai mulți agenți de izotonicitate pentru a minimiza durerea după injecție din cauza umflării celulare sau rupturii celulare. Un „agent de izotonicitate” este un compus care este tolerat fiziologic și conferă o tonicitate adecvată unei formulări pentru a preveni curgerea netă a apei prin membranele celulare care sunt în contact cu compoziția farmaceutică administrată. Agenții de izotonicitate cunoscuți includ glicerolul, sărurile cum ar fi clorura de sodiu, și monozaharidele care includ, dar nu se limitează la, manitol, dextroză și lactoză. Agenții de izotonicitate preferați sunt manitolul și clorura de sodiu.

În anumite realizări, compozițiile prezentei invenții includ un surfactant. Un „surfactant” este o substanță care scade tensiunea superficială a unui lichid. Exemple de surfactanți utilizați în compozițiile farmaceutice și care pot fi utilizați în anumite compoziții ale prezentei invenții includ polisorbitat 20, polisorbitat 80, polietilen glicoli (de exemplu, PEG 400, PEG 3000, TRITON X-100), polietilen glicol alchil eteri (de exemplu, BRIJ), polipropilen glicoli, copolimeri bloc (de exemplu, poloxamer, PLURONIC F68; poloxamer 407, PLURONIC F127; TETRONICS), sorbitan alchil ester (de exemplu, SPAN), ulei de ricin polietoxilat (de exemplu, KOLLIPHOR, CREMOFOR), și trehaloză.

Compozițiile farmaceutice din prezenta invenție pot conține de asemenea un conservant. Termenul „conservant” se referă la un compus adăugat la o formulare farmaceutică pentru a acționa ca un agent anti-microbian în compoziții multi-utilizare și/sau titratabile. Printre conservanții cunoscuți în domeniu ca fiind eficienți și acceptabili în formulările parenterale sunt clorura de benzoat, benzetoniul, clorohexidina, fenolul, m-cresolul, alcoolul benzilic, metil sau propil-parabenul, clorobutanolul, o-cresolul, p-cresolul, clorocresolul, nitratul fenilmercuric, timerosalul, acidul benzoic, și diferite amestecuri ale acestora. Conservantul fenolic include compuși fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparaben, și amestecuri ale acestora. Dacă un conservant este necesar, conservantul utilizat în compozițiile prezentei invenții este preferabil un conservant fenolic, preferabil m-cresol sau fenol.

Anumiți conservanți fenolici, cum ar fi fenolul și m-cresolul, sunt cunoscuți pentru legarea la insulină și la hexameri de insulină și stabilizând prin urmare o modificare conformațională care crește stabilitatea fie fizică, fie chimică, sau pe ambele. În compozițiile care cuprind alte proteine totuși, astfel de conservanți pot contribui la formarea de agregate proteice, sau de polimeri cu masă moleculară mare (HMWP). Vezi, de exemplu, Maa YF și Hsu CC, Int J Pharm 140: 155-168 (1996); Fransson J, și colab., Pharm. Res., 14: 606-612 (1997); Lam XM, și colab., Pharm. Res., 14: 725-729 (1997); Remmele RL Jr, și colab., Pharm Res 15: 200-208. (1998); Thirumangalathu R, și colab., J Pharm Sci 95: 1480-1497 (2006). Astfel de agregate proteice în formulările terapeutice sunt indezirabile din cauza tendinței lor de a induce un răspuns imun.

În anumite realizări preferate, secvența de aminoacizi a proteinei de fuziune din prezenta invenție este optimizată pentru a ameliora stabilitatea fizică a proteinei de fuziune în compozițiile care conțin de asemenea un conservant fenolic. De exemplu, prezenței inventatori au descoperit în mod surprinzător că prezența unei mutații de aminoacid la poziția 10 în analogul catenei A de insulină (X₁ variabil în analogul catenei A de insulină relatată în SEQ ID NO:2) reduce acumularea agregatelor de proteină de fuziune în prezența conservanților fenolici, așa cum se arată în studiile de stabilitate de mai jos.

Invenția este mai departe ilustrată prin următoarele exemple, care nu trebuie să fie interpretate ca limitative.

Exprimarea și purificarea proteinelor de fuziune

Proteinele de fuziune din prezenta invenție sunt produse într-un sistem de exprimare a celulei de mamifer utilizând linia celulară (GSKO) doborâtă (GS) de sintetază a glutaminei CHO. Gena GS doborâtă permite selecția strânsă a stringenței prin eliminarea acitivității de fundal a GS endogenă, care poate permite supraviețuirea celulelor slab sau ne-productive în condiții de selecție. Genele care codifică proteinele de fuziune sunt sub-clonate în sintetaza glutaminei (GS) care conține plasmidă exprimată. Secvența ADNc care codifică proteinele de fuziune este fuzionată în cadru cu secvența codificatoare a unei peptide semnal care ameliorează secreția de proteină de fuziune în mediul de cultură celulară. Exprimarea este dirijată de promotorul citomegalovirus (CMV). Celulele CHO GSKO sunt transfectate stabil utilizând electroporația și cantitatea adecvată de plasmidă recombinantă exprimată.

Celule transfectate suferă o selecție în masă în mediu fără glutamină. Acumulările transfectate sunt placate la densitate scăzută pentru a permite extinderea aproape clonală a celulelor exprimate stabil. Godeurile de frunte sunt analizate pentru exprimarea proteinelor de fuziune și extinse în culturi de suspensie fără ser pentru a fi utilizate pentru producție.

Proteinele de fuziune secretate în mediu pot fi purificate prin cromatografie de afinitate a proteinei A, urmată de cromatografie de excludere dimensională după tehnici cromatografice standard. Pe scurt, proteinele de fuziune din mediul limpezit sunt capturate de proteina A de selecție Mab (GE) care a fost echilibrată cu soluție salină tamponată cu fosfat pH 7,4. După o etapă de spălare cu soluție salină tamponată cu fosfat pH 7,4, proteinele de fuziune legate sunt eluate cu 10 mM acid citric pH 3,0. Frațiunile care conțin proteină de fuziune sunt acumulate și neutralizate prin adăugare de 1/10 volum de 1M Tris pH 8,0. Agregatele solubile și multimerii pot fi îndepărtate eficient prin tehnici obișnuite, incluzând excluderea dimensională, interacțiunea hidrofobă sau cromatografia cu schimb de ioni. Frațiunile care conțin proteină de fuziune monomerică (homodimer legat covalent), după cum s-a determinat prin cromatografia de excludere dimensională, sunt acumulate, filtrate steril, și depozitate.

Secvențele de aminoacizi din exemplele de proteine de fuziune din prezenta invenție sunt prezentate mai jos:

Exemplul 1:

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGEFHYGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGEGCPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

(SEQ ID NO:12)

Exemplul 2:

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

FVNQHLGCSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSIICSLYQLENYCGGGG
 GSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:16)

Exemplul 3:

10	20	30	40	50	60
10	20	30	40	50	60
70	80	90	100	110	120
130	140	150	160	170	180
190	200	210	220	230	240
250	260	270	280	290	300

FVNQHLGCSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSIICSLDQLENYCGGG
 GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGCPPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS

LG

(SEQ ID NO:17)

5 Exemplul 4:

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

FVNQHLGCSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSIICSLDQLENYCGGG
 GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:18)

Exemplul 5:

10	20	30	40	50	60
10	20	30	40	50	60
70	80	90	100	110	120
130	140	150	160	170	180
190	200	210	220	230	240
250	260	270	280	290	300

FVNQHLGCSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
 GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGCPPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS

LG

(SEQ ID NO:19)

10

15

Exemplul 6

10	20	30	40	50	60
FVGQHL	CGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCT	SICSLDQLENYCGGG			
70	80	90	100	110	120
GGQGGG	QGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP	PKPKDTLMISRTPEVTCVVV			
130	140	150	160	170	180
DVSQED	PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS				
190	200	210	220	230	240
NKGLPSS	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN				
250	260	270	280	290	300
GQPENNY	KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV	MHEALHNHYTQKSLSLS			

LG

(SEQ ID NO:20)

Exemplul 7

10	20	30	40	50	60
AGGQHL	CGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCT	SICSLDQLENYCGGGG			
70	80	90	100	110	120
GQGGGG	QGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFP	PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE			
130	140	150	160	170	180
DPEVQF	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS	VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP			
190	200	210	220	230	240
APIEKT	ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN	GQPEN			
250	260	270	280	290	
NYKTT	PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV	MHEALHNHYTQKSLSLS	SPG		

(SEQ ID NO:21)

5 Exemplul 8

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTGGSGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG				
70	80	90	100	110	120
GGQGGG	QGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFP	PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS			
70	80	90	100	110	120
HEDPEV	QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS	VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG			
70	80	90	100	110	120
LPAPIE	KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN	GQQP			
70	80	90	100	110	120
ENNYKT	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV	MHEALHNHYTQKSLSLS	SPG		

(SEQ ID NO:22)

Exemplul 9

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCT	SICSLYQLENYCGGGG			
70	80	90	100	110	120
GSGGGG	SGGGGGSGGGGSECPPCPAPPVAGPSVFLFP	PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH			
130	140	150	160	170	180
EDPEVQ	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS	VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL			
190	200	210	220	230	240
PAPIE	KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN	GQPE			
250	260	270	280	290	
NNYKT	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV	MHEALHNHYTQKSLSLS	SPG		

(SEQ ID NO:23)

10

15

Exemplul 10

```

10      20      30      40      50      60
FVGQHLGCSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
70      80      90      100     110     120
GGQGGGGGGGGGGGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
130     140     150     160     170     180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTQVHVDLNGKEYKCKVSNKG
190     200     210     220     230     240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
250     260     270     280     290
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:24)

Activitate in vitro

- 5 Loturile de test din exemplele 1-3, 5 și 9 sunt preparate în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS, pH 7,4) sau 10 mM tampon citrat (pH 6,5) și depozitate la 4°C. Insulina umană biosintetică (Eli Lilly and Company) este preparată în 0,01 N HCl și depozitată ca alicote congelate, sau preparate într-un amestec formulat care conține m-cresol, zinc, clorură de sodiu, și tampon Tris (pH 7,3) la 100 unități/mL și depozitat la 4°C.

- 10 Afinitățile proteinelor de fuziune sunt determinate în teste de legare la receptor efectuate pe membrane P1 preparate din celule 293EBNA transfectate stabil (celule de rinichi embrionar uman 293HEK care exprimă EBNA-1) care supraexprimă fie izoforma A a receptorului de insulină umană (hIR-A), fie izoforma B a receptorului de insulină umană (hIR-B) conținând o etichetă epitop C9 la C-terminal. Afinitățile de legare sunt determinate din teste de legare competitive a radio-liganzilor, efectuate în starea de echilibru utilizând (3-[¹²⁵I]-iodotirosil-A¹⁴)-
- 15 insulină recombinantă umană. Valorile pentru mostrele de test sunt calculate ca procentaj față de activitatea unei insuline umane neetichetate. Valorile IC₅₀ sunt determinate din analiza de regresie neliniară logistică cu 4 parametri (XLFit versiunea 4.0, IDBS). Dacă este necesar, parametrii de la partea superioară sau inferioară a curbei sunt setați până la 100 sau respectiv la 0.

- 20 Constanta de afinitate (K_i) este calculată din valoarea IC₅₀ pe baza ecuației $K_i = IC_{50} / (1 + D/K_d)$ unde D este egal cu concentrația de radio-liganzi utilizați în experiment și K_d este egal cu constanta de afinitate de legare la echilibru a radio-liganzilor pentru receptorul său cognat, determinată din analiza de legare saturată (hIR-A = 0,205 nM; hIR-B = 0,251 nM). Valorile raportate pentru K_i sunt prezentate ca medie geometrică ± eroarea standard a mediei (SEM), cu numărul de determinări replicate indicat prin „n” (Tabelul 1).

- 25 Proteinele de fuziune exemplificate au afinitate atât la hIR-A cât și la hIR-B. În comparație cu insulina umană, proteinele de fuziune exemplificate prezintă afinitate de legare redusă la hIR-A și la hIR-B (Tabelul 1).

Tabelul 1:

Mostră	Afinitate de legare la receptor, K _i , nM (SEM, n)	
	hIR-A	hIR-B
Exemplul 1	24,9 (4,3, n=10)	26,2 (4,3, n=10)
Exemplul 2	1,61 (0,06, n=3)	4,60 (0,86, n=3)
Exemplul 3	10,1 (1,5, n=4)	14,5 (2,3, n=4)
Exemplul 5	35,6 (10,4, n=4)	24,6 (3,4, n=4)
Exemplul 9	3,74 (1,20, n=2)	4,71 (1,78, n=2)
Insulină umană	0,166 (0,008, n=10)	0,202 (0,007, n=10)
Valorile K _i sunt medii geometrice. SEM este eroarea standard a mediei. n este numărul de observații.		

30

Studii in vivo**Studii pe modelul de diabet pe șobolanii tratați cu streptozotocin (STZ)**

- 35 Efectele proteinelor de fuziune sunt investigate pe modelul de diabet pe șobolanii tratați cu STZ. Șobolanii Sprague-Dawley masculi, cu greutatea corporală de 400-425 grame, sunt anesteziați cu isofluran și le este dată o singură injecție de Zanosar® (STZ item # 89256, Teva Parenteral Medicines, 40 mg/kg IV). Șobolanii sunt utilizați în studii la 3 zile după injectarea cu Zanosar®; în aceste studii sunt utilizate doar animalele hrănite, cu glucoza în sânge între 400-550 mg/dL.

- 40 Șobolanii sunt distribuiți în grupuri pentru a furniza o variantă comparabilă a glucozei în sânge și greutatea corporale și apoi sunt randomizați. Glucoza în sânge este măsurată utilizând un

glucometru Accucheck Aviva (Roche). Șobolanilor tratați cu STZ le este dată o singură injecție subcutanată (SC) în doză de 30 nmol/kg.

Probele de sange pentru măsurătorile de glucoză sunt colectate din sângerarea cozii. Animalele au acces liber la alimente și apă în experiment. Datele referitoare la glucoza din sânge sunt furnizate în Figura 1. Datele prezentate în figura 1 sunt media $\pm$ SEM (n=6 pentru Exemplele 1 și 8; n=3 pentru exemplele rămase). Datele referitoare la glucoza din sânge pentru momentele de timp din timpul perioadei de alimentație inițială (între 0 și 24 ore) sunt colectate, dar nu sunt incluse în Figura 1 pentru ușurința reprezentării vizuale. Așa cum se arată în Figura 1, Exemplele 1-10 furnizează fiecare scăderea glucozei pentru o perioadă prelungită de timp.

Proprietățile farmacocinetice din exemplele 1, 3-6 și 9-10 sunt de asemenea caracterizate după dozarea subcutanată (SC) a șobolanilor tratați cu STZ cum s-a descris mai sus. Datele sunt generate utilizând un test ELISA pentru receptorul de insulină, care necesită prezența insulinei care este capabilă să lege receptorul pentru insulină. Receptorul pentru insulină ELISA utilizează ca captură receptorul pentru insulină uman (R&D Systems#1544-IR/CF aa28-944). Receptorul pentru insulină uman este atașat la o placă Immulon 4 HBX prin anticorpul anti-6x HisTag de șoarece (Novagen 70796). Curba standard a proteinei de fuziune și mostrele sunt diluate în 100% plasmă K3 EDTA de șobolan și detectate de peroxidaza eliberată de IgG Fc anti-umană de șoarece (SouthernBiotech 9040-05). Concentrațiile din exemplele 3-6 și 9-10 la momente de timp de 336 de ore sunt toate între $22,1 \pm 9,8$ mg/mL și 1498 ± 690 mg/mL. Tabelul 3 prezintă concentrațiile din exemplul 1 în timp, și Tabelul 4 prezintă parametrii farmacocinetici după analiza non-compartimentală a datelor din exemplul 1. Datele susțin o durată extinsă a biodisponibilității pentru proteinele de fuziune din prezenta invenție.

Tabelul 3

Time (Ore)	Concentrație (mg/mL)
1	335 ± 104
6	3559 ± 447
12	5991 ± 1578
24	10614 ± 1334
48	12629 ± 1811
96	8766 ± 2028
168	5017 ± 253
240	3682 ± 509
336	2014 ± 134

Date reprezintă media și deviația standard a n=3.

25

Tabelul 4

Parametru PK	Rezultat
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{ore/mL}$)	1066 ± 363
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$6,81 \pm 1,62$
$T_{\max}$ (ore)	40 ± 14
CL sau CL/F (mL/ore/kg)	$2,15 \pm 0,91$
$t_{1/2}$ (ore)	82 ± 12
%F	147

Datele reprezintă media și deviația standard a n=3. Abrevieri: $AUC_{0-\infty}$ - aria de sub curba de la 0 la infinit, $C_{\max}$ - concentrație maximă, $T_{\max}$ - timp la concentrația maximă, CL - eliberare, F - biodisponibilitate, $t_{1/2}$ - perioadă de înjumătățire.

Studiu de acumulare euglicemică la șobolanii normali

Este efectuat un studiu de acumulare euglicemică pe șobolanii Sprague-Dawley masculi pentru a se înțelege activitatea globală in vivo din exemplul 1 asupra utilizării glucozei și pentru a determina activitatea din exemplul 1 în ficat versus țesuturile periferice. O perfuzie bolus/continuă de $3\text{-}^3\text{H}$ -glucoză este inițiată la șobolanii cateterizați cronic, nehrăniți peste noapte, pentru a determina producția de glucoză endogenă (EGP) în condiții de bază. O perfuzie intravenoasă bolus/continuă a articolului de test 7nmol/kg [bolus] și 1nmol/kg/oră [rată continuă] - sau comparator de insulină lispro - [fără bolus] și $0,75\text{ mU/kg/min}$ [rată continuă] - este apoi administrată și este inițiată o perfuzie intravenoasă variabilă de 20% glucoză și ajustată periodic pentru a menține concentrația de glucoză din sânge la 100-110 mg/dL. Ratele de bolus/perfuzie sunt selectate pentru a obține rate comparabile de perfuzie cu glucoză (GIR) și supresie comparabilă de EGP în condiții de acumulare euglicemică la fiecare grup. Este administrat

40

- somatostatin pentru a inhiba secreția de insulină endogenă. Probele de sânge arterial sunt obținute în timpul experimentului pentru a analiza hematocritul, insulina plasmatică, și acizii grași liberi, C-peptidele, și EGP de bază și acumulată. La sfârșitul experimentului, este administrată 2-[1-¹⁴C]-deoxiglucroză pentru a măsura absorbția glucozei de către țesut sub concentrații de glucoză în stare stabilă. În aceste condiții de potrivire, activitatea periferică a articolului de test și comparatorilor este analizată din punctul de vedere al absorbției de glucoză în mușchiul soleus și supresia de acizi grași liberi din plasmă (FFA). Toate datele sunt analizate utilizând o analiză unidirecțională a varianței cu testul post-hoc al lui Dunnett, utilizând grupul de insulină lispro ca comparator de control.
- Dozele bolus și de perfuzie din exemplul 1 au condus la concentrația de echilibru în plasmă de 274 ± 57 nM în decursul unui experiment de acumulare. Așa cum se arată în Tabelul 5, ambele grupuri de animale au obținut GIR comparabile în timpul fazei de acumulare a experimentului. Media glucozei din sânge a grupului din exemplul 1 este puțin mai ridicată decât cea a grupului de insulină lispro. Ambele grupuri au rate EGP de bază și cumulată, similare (Tabelul 5). Mai mult, procentajul de modificare față de EGP de bază în grupul din exemplul 1 este comparabil cu cel al grupului de control de insulină lispro (Tabelul 5). Pentru a evalua activitatea periferică în condiții de acumulare echivalente, sunt măsurate supresia plasmei FFA și absorbția de glucoză în mușchi. În timp ce insulina lispro a condus la o reducere în nivelurile FFA de plasmă în decursul experimentului de acumulare, Exemplul 1 nu a făcut acest lucru (Tabelul 5). În plus, perfuzia din exemplul 1 a condus la o scădere cu 33% în absorbția de glucoză în mușchiul soleus în comparație cu insulina lispro (Tabelul 5). Colectiv, aceste date au indicat că Exemplul 1 afișează activitate periferică redusă în comparație cu insulina lispro.

Tabelul 5:

		Insulină lispro	Exemplul 1
Glucoza în sange (mg/dL)		$106,3 \pm 2,2$	$111,8 \pm 1,2^*$
GIR (mg/kg/min)		$4,71 \pm 0,46$	$4,72 \pm 0,13$
Rata EGP (mg/kg/min)	de bază	$5,062 \pm 0,141$	$5,004 \pm 0,093$
	acumulat	$3,607 \pm 0,241$	$3,509 \pm 0,160$
% Modificare față de EGP de bază		$-29,3 \pm 3,5$	$-30,1 \pm 2,5$
% Supresia plasmei FFA față de bază		$-14,5 \pm 4,1$	$9,9 \pm 2,4^*$
Rg ($\mu\text{mol}/100\text{mg}/\text{min}$)		$11,34 \pm 1,73$	$7,66 \pm 1,38$

Valorile sunt afișate ca medie $\pm$ SEM a 13 animale pentru insulina lispro și 17 animale pentru Exemplul 1. Rg = indice metabolic al glucozei. Analiza statistică a fost completată de ANOVA unidirecțională urmată de testul post-hoc al lui Dunnett. * = diferențe semnificative față de insulina lispro ($p < 0,05$).

25

Eficacitatea in vivo la maimuța cynomolguss

- Parametrii farmacocinetici (PK) din exemplul 1 sunt evaluați după o singură doză intravenoasă de 1,5 nmol/kg și o singură doză subcutanată de 3 nmol/kg la maimuța cynomolguss. Mostrele de plasmă pentru analiza PK sunt colectate de la trei animale pe grup/cale, în decursul a 3 săptămâni. Două teste sunt utilizate pentru analiza PK: receptorul pentru insulină ELISA și IgG Fc totală ELISA. Receptorul pentru insulină ELISA utilizează receptorul uman pentru insulină (R&D Systems 1544-IR/CF) ca captură. Receptorul uman pentru insulină este atașat la o placă Immulon 4 HBX de anticorpi anti-HisTag de șoarece (Novagen 70796). Curba standard și mostrele din Exemplul 1 sunt diluate în 100% plasmă de maimuță cynomolgus (anticoagulantul a fost K3 EDTA) și detectate de peroxidaza din hrean IgG Fc anti-umană de șoarece (SouthernBiotech 9040-05). IgG totală ELISA utilizează IgG₂ anti-uman (Abcam ab1933) ca reagent de captură. Exemplul 1 este diluat în 100% plasmă de maimuță cynomolgus și anticorpi de detecție este același ca la receptorul pentru insulină ELISA. Rezultatele ambelor teste sunt prezentate în Tabelul 6, și parametrii PK asociați sunt prezentați în Tabelul 7. Exemplul 1 prezintă biodisponibilitatea completă la maimuțe, și testul de insulină activă și testul de Fc total, care au dat rezultate similare.

40

Tabelul 6. PK din Exemplul 1 la maimuțele cynomolguss normale.

Timp (ore)	Concentrație $\pm$ SD (ng/mL)			
	Receptor pentru insulină ELISA		Fc total ELISA	
	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	$<43,75 \pm \text{NC}$	1708 ± 1219	$<43,75 \pm \text{NC}$
3	863 ± 114	87 ± 25	$798 \pm \text{NC}$	92 ± 22
6	726 ± 119	272 ± 31	688 ± 96	209 ± 116

Timp (ore)	Concentrație $\pm$ SD (ng/mL)			
	Receptor pentru insulină ELISA		Fc total ELISA	
	IV	SC	IV	SC
	1,5 nmol/kg	3,0 nmol/kg	1,5 nmol/kg	3,0 nmol/kg
12	576 $\pm$ 88	579 $\pm$ 78	457 $\pm$ 178	409 $\pm$ 145
24	422 $\pm$ 67	788 $\pm$ 69	332 $\pm$ 95	685 $\pm$ 359
48	299 $\pm$ 39	805 $\pm$ 55	260 $\pm$ 19	802 $\pm$ 64
72	219 $\pm$ 42	651 $\pm$ 83	199 $\pm$ 34	770 $\pm$ 83
96	173 $\pm$ 26	544 $\pm$ 89	159 $\pm$ 25	703 $\pm$ 390
120	146 $\pm$ 28	452 $\pm$ 55	152 $\pm$ 27	574 $\pm$ 160
168	83 $\pm$ 13	289 $\pm$ 54	126 $\pm$ NC	395 $\pm$ 70
216	48 $\pm$ NC	183 $\pm$ 44	99 $\pm$ NC	208 $\pm$ 123
240	<43,75 $\pm$ NC	145 $\pm$ 25	80 $\pm$ NC	242 $\pm$ NC
336	<43,75 $\pm$ NC	63 $\pm$ NC	47 $\pm$ NC	NC
504	<43,75 $\pm$ NC	<43,75 $\pm$ NC	<43,75 $\pm$ NC	<43,75 $\pm$ NC

Datele reprezintă media și deviația standard de la n=3. Abrevieri: IV = intravenoasă; SD = deviație standard; NC = necalculat

Tabelul 7. Parametrii PK derivați din analiza non-compartmentală a datelor din Tabelul 6.

	Receptor pentru insulină ELISA		Fc total ELISA	
	IV	SC	IV	SC
Doză (nmol/kg)	1,5	3,0	1,5	3,0
AUC _{0-inf} (μ g*ore/mL)	51,1 $\pm$ 6,4	127 $\pm$ 7	62,7 $\pm$ 5,8	171 $\pm$ 17
C _{max} (μ g/mL)	1,22 $\pm$ 0,22	0,82 $\pm$ 0,06	2,24 $\pm$ 1,38	0,90 $\pm$ 0,21
T _{max} (ore)	0	48 $\pm$ 24	0	64 $\pm$ 28
CL sau CL/F (mL/ore/kg)	1,99 $\pm$ 0,24	1,59 $\pm$ 0,09	1,61 $\pm$ 0,15	1,19 $\pm$ 0,11
T _{1/2} (ore)	61 $\pm$ 9	70 $\pm$ 2	127 $\pm$ 18	148 $\pm$ 53
V _{ss} (mL/kg)	164 $\pm$ 31	NA	256 $\pm$ 47	NA
%F	NA	125	NA	136

Datele reprezintă media și deviația standard de la n=3. Abrevieri: AUC_{0-inf}- aria de sub curba de la 0 la infinit, C_{max}- concentrație maximă (pentru administrare IV C_{max} este concentrația extrapolată la momentul 0), T_{max} - timp la concentrație maximă, CL - eliberare, F - biodisponibilitate, t_{1/2} - perioadă de înjumătățire, V_{ss} - volum de distribuție în stare de echilibru, NA - neaplicabil.

5

Stabilitate**Formularea de 65 mg/mL neconservată din exemplul 1**

- Exemplul 1 este formulat la 65 mg/mL în 10 mM citrat, 46,4 mg/mL manitol, 0,02% polisorbitat 80, pH 6,5 și depozitat la 30°C. Mostrele sunt analizate pentru procentajul de masă moleculară mare prin cromatografie de excludere dimensională (SEC) la 0, 2, și 4 săptămâni prin injectarea a 1 μ L de mostră de 65 mg/mL. SEC analitică este efectuată pe un sistem Agilent 1100 echipat cu o coloană TSKgel SuperSW3000 (Tosoh Bioscience) și 50 mM fosfat de sodiu, 300 mM NaCl, pH 7,0 fază mobilă curgând la 0,4 mL/min timp de 15 minute. Maximele sunt detectate la o absorbantă de 280 nm și cromatogramele sunt analizate utilizând software-ul ChemStation.
- Procentajul de masă moleculară mare la momentul zero este 1,13%, după două săptămâni este 1,68%, și după patru săptămâni este 1,74%. Aceste rezultate susțin stabilitatea din exemplul 1 la concentrația de 65 mg/mL cu creșterea minimă a agregatului solubil după 4 săptămâni la 30°C.

Formulări de 1 mg/mL conservate și neconservate din exemplele 1 și 3

- Exemplele 1 și 3 sunt formulate la 1 mg/mL în 10 mM citrat, pH 6,5 în prezența sau absența a 30 mM m-Cresol și depozitate la 30°C. Mostrele sunt analizate pentru procentajul de masă moleculară mare prin cromatografie de excludere dimensională (SEC) la momentul zero și la 2 săptămâni prin injectarea a 10 μ L de mostră de 1 mg/mL. SEC analitică este efectuată pe un sistem Agilent 1100 echipat cu o coloană TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience) și PBS + 350 mM NaCl, pH 7,4 fază mobilă curgând la 0,5 mL/min timp de 35 minute sau 45 minute pentru mostre în absența sau respectiv prezența de m-cresol. Maximele sunt detectate la o absorbantă de 214 nm și cromatogramele sunt analizate utilizând software-ul ChemStation. Pentru exemplul 3, fără și cu m-cresol, procentajul de masă moleculară mare la momentul zero este 0,2% și respectiv 3,06%. Procentajul de masă moleculară mare la 2 săptămâni fără și cu m-cresol a fost 0,2% și respectiv 1,73%. Aceste rezultate arată o creștere imediată a agregatului solubil după adăugarea de m-cresol pentru exemplul 3 la momentul zero. Pentru exemplul 1, în absența și prezența de m-

cresol, procentajul de masă moleculară mare la momentul zero a fost 0,16% și respectiv 0,15%. Procentajul de masă moleculară mare la 2 săptămâni în absența și prezența de m-cresol a fost 0,18% și respectiv 0,31%. Aceste rezultate demonstrează stabilitatea, în prezența conservantului, din exemplul 1, care include modificarea aminoacidului la poziția 10 în analogul catenei A de insulină (X₁ variabil în SEQ ID NO:2, Z₃ în prima proteină de fuziune descrisă mai sus) la un reziduu T, față de exemplul 3, care include reziduu I nativ la aceeași poziție, dar care altfel cuprinde aceeași secvență de aminoacizi a agonistului receptor pentru insulină ca în exemplul 1.

Secvențe

10

SEQ ID NO:1 - Analog al catenei B de insulină

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉

in care X₁ este F, Q sau A; X₂ este V sau G; X₃ este N, K, D, G, Q, A sau E; X₄ este E, Y, Q, sau H; X₅ este H sau F; X₆ este G, T, S, H, V sau este absent; X₇ este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X₈ este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X₉ este G, T, S, E, K, A sau este absent, cu condiția că analogul catenei B de insulină să includă cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, sau X₉

15

SEQ ID NO:2 - Analog al catenei A de insulină

GIVEQCCTSX₁CSLX₂QLENYCX₃X₄

X₁ este T sau I; X₂ este D, Y, Q sau E; X₃ este G, N, S sau A; și X₄ este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că dacă X₃ este N, atunci X₄ trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N

20

SEQ ID NO:3 - Primul agent de legătură peptidic

X₁GX₂GGGG, in care X₁ este G sau este absent; și X₂ este G, S sau este absent

SEQ ID NO:4 - Agonist receptor pentru insulină

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁GGGGGIVEQCCTSX₁₂CSL

25

X₁₃QLENYCX₁₄X₁₅

in care X₁ este F, Q sau A; X₂ este V sau G; X₃ este N, K, D, G, Q, A sau E; X₄ este E, Y, Q, sau H; X₅ este H sau F; X₆ este G, T, S, H, V sau este absent; X₇ este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X₈ este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X₉ este G, T, S, E, K, A sau este absent; X₁₀ este G sau este absent; X₁₁ este G, S sau este absent; X₁₂ este T sau I; X₁₃ este D, Y, Q sau E; X₁₄ este G, N, S sau A; și X₁₅ este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că atunci cel puțin unul dintre X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, sau X₉ trebuie să fie un aminoacid diferit de cel găsit, respectiv, la poziție B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ sau B₃₀ ale catenei B a unei molecule de insulină umană, și în plus cu condiția că dacă X₁₄ este N, atunci X₁₅ trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N.

35

SEQ ID NO:5 - Agonist receptor pentru insulină

FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG

SEQ ID NO:6 - Al doilea agent de legătură peptidic

GGGGX₁GGGGX₂GGGGX₃GGGGX₄X₅X₆

in care X₁ este Q sau E; X₂ este Q sau E; X₃ este Q sau E; X₄ este G, E, Q sau este absent; X₅ este G sau absent; și X₆ este G sau este absent

40

SEQ ID NO:7 - Al doilea agent de legătură peptidic

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG

SEQ ID NO:8 - Regiunea IgG Fc umană

CPPCPAPPELLGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGX₆

45

in care X_1 este F, Q sau E; X_2 este F, Q sau E; X_3 este V sau T; X_4 este V sau T; X_5 este N, D sau Q; și X_6 este K sau este absent

SEQ ID NO:9 - Regiunea IgG Fc umană

PCPPCPAPEAAGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSX₆LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGX₇

- 5 in care X_1 este F, Q sau E; X_2 F, Q sau E; X_3 este V sau T; X_4 este V sau T; X_5 este N, D sau Q; X_6 este R, sau K; X_7 este K sau este absent

SEQ ID NO:10 - Regiunea IgG Fc umană

ECPPCPAPPVAGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA
PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGX₆

- 10 in care X_1 este F, Q sau E; X_2 este F, Q sau E; X_3 este V sau T; X_4 este V sau T; X_5 este N, D sau Q; și X_6 este K sau absent

SEQ ID NO:11 - Proteină de fuziune

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁GGGGGIVEQCCTSX₁₂CSL
X₁₃QLENYCX₁₄X₁₅GGGGX₁₆GGGGX₁₇GGGGX₁₈GGGGX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂CPPCPAPX₂₃X₂₄AGX
25PSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSX₂₆EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTX₂₇RVVSVLTVX₂₈HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPXP₂₉X₃₀IEKTISKX₃₁KGQPREPQ
VYTLPPSX₃₂EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPX₃₃LDSDGSF
FLYSX₃₄LTVDKSRWQX₃₅GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSX₃₆G

- 15 in care X_1 este F, Q sau A; X_2 este V sau G; X_3 este N, K, D, G, Q, A sau E; X_4 este E, Y, Q, sau H; X_5 este H sau F; X_6 este G, T, S, H, V sau este absent; X_7 este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X_8 este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X_9 este G, T, S, E, K, A sau este absent, cu condiția că atunci cel puțin unul dintre X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 este un aminoacid altul decât cel care este prezent, respectiv, la pozițiile B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ sau B₃₀ ale unei catene B de insulină umană; X_{10} este G sau este absent; X_{11} este G, S sau este absent; X_{12} este T sau I; X_{13} este D, Y, Q sau E; X_{14} este G, N, S sau A; X_{15} este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că dacă X_{14} este N, atunci X_{15} trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N; X_{16} este Q sau E; X_{17} este Q sau E; X_{18} este Q sau E; X_{19} este G, E, Q sau este absent; X_{20} este G sau absent; X_{21} este G sau este absent; X_{22} este E sau P; X_{23} este E sau P; X_{24} este A sau V; X_{25} este G sau este absent; X_{26} este Q sau H; X_{27} este Y sau F; X_{28} este L sau V; X_{29} este S sau A; X_{30} este S sau P; X_{31} este A sau T; X_{32} este Q sau R; X_{33} este V sau M; X_{34} este R sau K; X_{35} este E sau Q; și
- 25 X_{36} este L sau P.

SEQ ID NO:12 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGGGGGGGGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

SEQ ID NO:13 - Catena A de insulină umană

5 GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

SEQ ID NO:14 - Catena B de insulină umană

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

SEQ ID NO:15 - Primul agent de legătură peptidic

GGSGGGG

SEQ ID NO:16 - Proteină de fuziune

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

10

SEQ ID NO:17 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGGGGGGGGGGGGCPPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
250	260	270	280	290	300
GQPENNYKTTTPVLDSGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS					

LG

15

SEQ ID NO:18 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG					
70	80	90	100	110	120
GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE					
130	140	150	160	170	180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
190	200	210	220	230	240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN					
250	260	270	280	290	
NYKTTTPMLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

SEQ ID NO:19 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGGGGGGGGGGGGGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
250	260	270	280	290	300
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS					

LG

SEQ ID NO:20 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVGQHLCSHSLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGGGGGGGGGGGGGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
250	260	270	280	290	300
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS					

5

LG

SEQ ID NO:21 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
AGGQHLCSHSLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGGG					
70	80	90	100	110	120
GQGGGGGGGGGGGGGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH					
130	140	150	160	170	180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
190	200	210	220	230	240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN					
250	260	270	280	290	
NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLSPG					

SEQ ID NO:22 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTTGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGGGGGGGGGGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLSPG					

10

SEQ ID NO:23 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHLVEALELVC	GERGFF	YTEETGGGGGGG	GIVEQCCT	SICSLYQLENYCGGGG
70	80	90	100	110	120
GSGGGG	GSGGGG	GSGGGG	SECP	PCPAPP	VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
130	140	150	160	170	180
EDPEVQ	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS	VLTVVH	QDWLNGKEYKCKVSNKGL		
190	200	210	220	230	240
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE					
250	260	270	280	290	
NNYKTT	PPMLDS	SGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG		

SEQ ID NO:24 - Proteină de fuziune

10	20	30	40	50	60
FVGQHL	CGSHLVEALELVC	GERGFHYGGGGGGG	GIVEQCCTSTC	SLDQLENYCGGG	
70	80	90	100	110	120
GGQGGG	GQGGGQGGGG	ECPP	CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS		
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQ	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS	VLTVVH	QDWLNGKEYKCKVSNKG		
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTT	PPMLDS	SGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG		

5 SEQ ID NO:25 - GLP-1

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

LISTĂ DE SECVENȚE

- 10 <110> Eli Lilly și Company
 <120> PROTEINE DE FUZIUNE
 <130> X20356
 <150> 62/158079
 <151> 2015-05-07
- 15 <160> 25
 <170> Versiune Patentln 3.5
 <210> 1
 <211> 30
 <212> PRT
- 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
- 25 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa la poziția 1 este Phe, Gln sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (2)..(2)
- 30 <223> Xaa la poziția 2 este Val sau Gly
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa la poziția 3 este Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala sau Glu
- 35 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa la poziția 16 este Glu, Tyr, Gln sau His
 <220>
- 40 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (25)..(25)

<223> Xaa la poziția 25 este His sau Phe
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (27)..(27)
 5 <223> Xaa la poziția 27 este Gly, Thr, Ser, His, Val, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (28)..(28)
 10 <223> Xaa la poziția 28 este Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa la poziția 29 este Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, sau este absent
 <220>
 15 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa la poziția 30 este Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, sau este 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
 20 <210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa la poziția 10 este Thr sau Ile
 30 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (14) .. (14)
 <223> Xaa la poziția 14 este Asp, Tyr, Gln sau Glu
 <220>
 35 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (21) .. (21)
 <223> Xaa la poziția 21 este Gly, Asn, Ser, sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 40 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa la poziția 22 este orice aminoacid care apare natural, sau este 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
 45 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 50 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa la poziția 1 este Gly sau este absent

- <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa la poziția 3 este Gly, Ser, sau este absent
 5 <400> 3
 Xaa Gly Xaa Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 4
 <211> 59
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa la poziția 1 este Phe, Gln, sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (2)..(2)
 20 <223> Xaa la poziția 2 este Val sau Gly
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.:<222> (3)..(3)
 <223> Xaa la poziția 3 este Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, sau Glu
 <220>
 25 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa la poziția 16 este Glu, Tyr, Gln, sau His
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 30 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa la poziția 25 este His sau Phe
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (27)..(27)
 35 <223> Xaa la poziția 27 este Gly, Thr, Ser, His, Val, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa la poziția 28 este Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, sau este absent
 40 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa la poziția 29 este Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, sau este absent
 <220>
 45 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa la poziția 30 este Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 50 <222> (31) .. (31)
 <223> Xaa la poziția 31 este Gly sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (33)..(33)
 55 <223> Xaa la poziția 33 este Gly, Ser, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa la poziția 47 este Thr sau Ile

- <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (51) .. (51)
 <223> Xaa la poziția 51 este Asp, Tyr, Gln, sau Glu
 5 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa la poziția 58 este Gly, Asn, Ser, sau Ala
 <220>
 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa la poziția 59 este orice aminoacid care apare natural, sau este 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
 15 <210> 5
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <223> Construcție sintetică
 <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
 35 40 45

 Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
 50 55
 25 <210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 30 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa la poziția 5 este Gln sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 35 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa la poziția 10 este Gln sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (15) .. (15)
 40 <223> Xaa la poziția 15 este Gln sau Glu

<220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa la poziția 20 este Gly, Glu, Gln, sau este absent
 5 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (21) .. (21)
 <223> Xaa la poziția 21 este Gly sau absent
 <220>
 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa la poziția 21 este Gly sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa la poziția 22 este Gly sau este 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
 20 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 25 <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
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 35 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa la poziția 16 este Phe, Gln sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (18) .. (18)
 40 <223> Xaa la poziția 18 este Phe, Gln sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa la poziția 37 este Val sau Thr
 45 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa la poziția 39 este Val sau Thr
 <220>
 50 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa la poziția 72 este Asn, Asp sau Gln

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (222) .. (222)

<223> Xaa la poziția 222 este Lys sau este absent

5 <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

10 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<220>

15 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa la poziția 17 este Phe, Gln sau Glu

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

20 <222> (19) .. (19)

<223> Xaa la poziția 19 este Phe, Gln sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (38)..(38)
 5 <223> Xaa la poziția 38 este Val sau Thr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa la poziția 40 este Val sau Thr
 10 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa la poziția 73 este Asn, Asp sau Gln
 <220>
 15 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (185) .. (185)
 <223> Xaa la poziția 185 este Arg sau Lys
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 20 <222> (223) .. (223)
 <223> Xaa la poziția 223 este Lys sau este 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

```

- 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
- 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa la poziția 16 este Phe, Gln, sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (18) .. (18)
 <223> Xaa la poziția 18 este Phe, Gln, sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (37)..(37)
- 20 <223> Xaa la poziția 37 este Val sau Thr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa la poziția 39 este Val sau Thr
- 25 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (72)..(72)

<223> Xaa la poziția 72 este Asn, Asp, sau Gln

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (222) .. (222)

5 <223> Xaa la poziția 222 este Lys sau este 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

10 <210> 11

<211> 303

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Construcție sintetică

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (1)..(1)

- <223> Xaa la poziția 1 este Phe, Gln, sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (2)..(2)
 5 <223> Xaa la poziția 2 este Val sau Gly
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Xaa la poziția 3 este Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa la poziția 16 este Glu, Tyr, Gln, sau His
 <220>
 15 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa la poziția 25 este His sau Phe
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 20 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa la poziția 27 este Gly, Thr, Ser, His, Val, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (28)..(28)
 25 <223> Xaa la poziția 28 este Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa la poziția 29 este Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, sau este absent
 30 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa la poziția 30 este Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, sau este absent
 <220>
 35 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (31) .. (31)
 <223> Xaa la poziția 31 este Gly, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 40 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa la poziția 33 este Gly, Ser, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (47)..(47)
 45 <223> Xaa la poziția 47 este Thr sau Ile
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (51) .. (51)
 <223> Xaa la poziția 51 este Asp, Tyr, Gln, sau Glu
 50 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa la poziția 58 este Gly, Asn, Ser sau Ala
 <220>
 55 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa la poziția 59 este orice aminoacid care apare natural, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 60 <222> (64)..(64)
 <223> Xaa la poziția 64 este Gln sau Glu

- <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa la poziția 69 este Gln sau Glu
 5 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa la poziția 74 este Gln sau Glu
 <220>
 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa la poziția 79 este Gly, Glu, Gln, sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa la poziția 80 este Gly sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (81)..(81)
 20 <223> Xaa la poziția 81 este Gly sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (82)..(82)
 <223> Xaa la poziția 82 este Glu sau Pro
 25 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (90)..(90)
 <223> Xaa la poziția 90 este Glu sau Pro
 <220>
 30 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa la poziția 91 este Ala și Val
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 35 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa la poziția 94 este Gly sau este absent
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (125)..(125)
 40 <223> Xaa la poziția 125 este Gln sau His
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (157)..(157)
 <223> Xaa la poziția 157 este Tyr sau Phe
 45 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (166)..(166)
 <223> Xaa la poziția 166 este Leu sau Val
 <220>
 50 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (187)..(187)
 <223> Xaa la poziția 187 este Ser sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 55 <222> (188)..(188)
 <223> Xaa la poziția 188 este Ser sau Pro
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (196)..(196)
 60 <223> Xaa la poziția 196 este Ala sau Thr

- <220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (212)..(212)
<223> Xaa la poziția 212 este Gln sau Arg
- 5 <220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (254)..(254)
<223> Xaa la poziția 254 este Val sau Met
<220>
- 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (266)..(266)
<223> Xaa la poziția 266 este Arg sau Lys
<220>
- 15 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (276)..(276)
<223> Xaa la poziția 276 este Glu sau Gln
<220>
- 20 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (302)..(302)
<223> Xaa la poziția 302 este Leu sau 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
 100 105 110
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Xaa Glu Asp Pro
 115 120 125
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 130 135 140
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Xaa Arg Val Val
 145 150 155 160
 Ser Val Leu Thr Val Xaa His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 165 170 175
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Xaa Xaa Ile Glu Lys Thr
 180 185 190
 Ile Ser Lys Xaa Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 195 200 205
 Pro Pro Ser Xaa Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 210 215 220
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 225 230 235 240
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Xaa Leu Asp
 245 250 255
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Xaa Leu Thr Val Asp Lys Ser
 260 265 270
 Arg Trp Gln Xaa Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 275 280 285
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Xaa Gly
 290 295 300
 <210> 12

- <211> 299
- <212> PRT
- <213> Secvență artificială
- <220>
- 5 <223> Construcție sintetică
- <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

5 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <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
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <400> 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

20 <210> 16
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> Construcție sintetică
 <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 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
 145 150 155 160
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 165 170 175
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 180 185 190
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 195 200 205
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 210 215 220
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 225 230 235 240
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 245 250 255
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 260 265 270
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 275 280 285
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 290 295 300
 <210> 17

- <211> 302
- <212> PRT
- <213> Secvență artificială
- <220>
- 5 <223> Construcție sintetică
- <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> Secvență artificială
- <220>
- 5 <223> Construcție sintetică
- <400> 18

MD/EP 3292141 T2 2020.07.31

50

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 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 145	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr 150	Phe	Arg	Val	Val 155	Ser	Val	Leu	Thr	Val 160	Val
His	Gln	Asp	Trp	Leu 165	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 170	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 175	Asn
Lys	Gly	Leu	Pro 180	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 185	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr 190	Lys	Gly
Gln	Pro	Arg 195	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 200	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 205	Arg	Glu	Glu
Met	Thr 210	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 215	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 220	Lys	Gly	Phe	Tyr
Pro 225	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 230	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 235	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 240
Asn	Tyr	Lys	Thr 245	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp 250	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 255	Phe
Leu	Tyr	Ser	Lys 260	Leu	Thr	Val	Asp	Lys 265	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 270	Gly	Asn
Val	Phe	Ser 275	Cys	Ser	Val	Met	His 280	Glu	Ala	Leu	His	Asn 285	His	Tyr	Thr
Gln	Lys 290	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 295	Pro	Gly							
<210> 19															
<211> 302															
<212> PRT															
<213> Secvență artificială															
<220>															
<223> Construcție sintetică															
<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 Gln Gly
 50 55 60
 Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln 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

- <211> 302
- <212> PRT
- <213> Secvență artificială
- <220>
- 5 <223> Construcție sintetică
- <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> Secvență artificială
- <220>
- 5 <223> Construcție sintetică
- <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							
<210>	22						295								

<211> 299
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <223> Construcție sintetică
 <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> Secvență artificială
<220>
<223> Construcție sintetică
<400> 23

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 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 Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 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> Secvență artificială
- <220>
- 5 <223> Construcție sintetică
- <400> 24

MD/EP 3292141 T2 2020.07.31

61

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

- CN-A- 103 509 118
- KR-B1- 101 324 828

(57) Revendicări:

1. O proteină de fuziune care cuprinde:

a) un agonist receptor pentru insulină având formula generală $Z_1-Z_2-Z_3$, în care:

i) Z_1 este un analog al catenei B de insulină, cuprinzând secvența de aminoacizi: $X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

în care X_1 este F, Q sau A; X_2 este V sau G; X_3 este N, K, D, G, Q, A sau E; X_4 este E, Y, Q, sau H; X_5 este H sau F; X_6 este G, T, S, H, V sau este absent; X_7 este G, E, P, K, D, S, H sau este absent; X_8 este G, E, K, P, Q, D, H sau este absent; X_9 este G, T, S, E, K, A sau este absent, cu condiția ca analogul catenei B de insulină să includă cel puțin o modificare din secvența de aminoacizi a catenei B a unei molecule de insulină umană la X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , sau X_9 (SEQ ID NO:1);

ii) Z_2 este un prim agent de legătură peptidic care cuprinde 5 până la 10 aminoacizi, în care cel puțin 5 din respectivi aminoacizi sunt reziduuri G; și

iii) Z_3 este un analog al catenei A de insulină care cuprinde secvența de aminoacizi: $GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

în care X_1 este T sau I; X_2 este D, Y, Q sau E; X_3 este G, N, S sau A; și X_4 este orice aminoacid care apare natural, sau este absent, cu condiția că dacă X_3 este N, atunci X_4 trebuie să fie un aminoacid altul decât G sau N (SEQ ID NO:2);

b) un al doilea agent de legătură peptidic având între 10 și 25 aminoacizi, în care cel puțin 50% din respectivi aminoacizi sunt reziduuri G; și

c) o regiune IgG Fc umană;

în care reziduul C-terminal al agonistului receptor de insulină este direct fuzionat la reziduul N-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic, și reziduul C-terminal al celui de al doilea agent de legătură peptidic este direct fuzionat la reziduul N-terminal al regiunii IgG Fc umane.

2. Proteina de fuziune conform revendicării 1, în care:

analogul catenei B de insulină include cel puțin o modificare față de secvența de aminoacizi a catenei B de insulină umană la X_4 sau X_5 din SEQ ID NO:1; și

analogul catenei A de insulină include cel puțin o modificare față de secvența de aminoacizi a catenei A de insulină umană la X_1 sau X_2 din SEQ ID NO:2.

3. Proteina de fuziune din oricare dintre revendicările 1 sau 2, în care:

analogul catenei B de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:1, în care: X_1 este F; X_2 este V; X_3 este N sau D; X_4 este E; X_5 este H; și

analogul catenei A de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:2, în care: X_1 este I sau T; X_2 este D; X_3 este G; și X_4 este absent.

4. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care analogul catenei B de insulină cuprinde secvența din SEQ ID NO:1, în care X_6 - X_9 sunt fiecare G.

5. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care primul agent de legătură peptidic cuprinde următoarea secvență de aminoacizi:

X_1GX_2GGGG

în care X_1 este G sau este absent; și X_2 este G, S sau este absent (SEQ ID NO:3).

6. Proteina de fuziune conform revendicării 5, în care X_1 și X_2 din SEQ ID NO:3 sunt G și respectiv S.

7. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-6, în care agonistul receptor de insulină are următoarea secvență de aminoacizi:

$FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYC$

G (SEQ ID NO:5).

8. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care al doilea agent de

legătură peptidică cuprinde o peptidă având secvența $[GGGGX]_n$ în care X este Q, E sau S; și în care n este 2-5.

9. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-8, în care al doilea agent de legătură peptidică cuprinde următoarea secvență de aminoacizi:

GGGGX₁GGGGX₂GGGGX₃GGGGX₄X₅X₆

X₁ este Q sau E

X₂ este Q sau E

X₃ este Q sau E

X₄ este G, E, Q sau este absent

X₅ este G sau absent; și

X₆ este G sau este absent

(SEQ ID NO:6).

10. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-9, în care al doilea agent de legătură peptidică are următoarea secvență de aminoacizi:

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO:7).

11. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-10, în care regiunea IgG Fc umană este o regiune Fc de la un IgG1, IgG2 sau IgG4.

12. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-11, în care regiunea IgG Fc umană cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 și SEQ ID NO:10.

13. O proteină de fuziune care are secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:12.

14. Un homodimer a două proteine de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-13.

15. O compoziție farmaceutică care cuprinde fie o proteină de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-13, fie un homodimer conform revendicării 14, și cel puțin un excipient.

16. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 15, care cuprinde în plus citrat, acid citric, polisorbit 80, și manitol.

17. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 15 sau revendicarea 16 în care pH-ul variază de la aproximativ 6,0 până la aproximativ 6,75.

18. Compoziția farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 15 până la 17 cuprinzând în plus dulaglutidă.

19. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-13 pentru utilizare în terapie.

20. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-13 pentru utilizare în tratamentul diabetului zaharat.

21. Proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-13 pentru utilizare simultană, separată sau în combinație secvențială cu dulaglutide, în tratamentul diabetului zaharat.

22. Homodimerul conform revendicării 14 pentru utilizare simultană, separată sau în combinație secvențială cu dulaglutide, în tratamentul diabetului zaharat.

23. O polinucleotidă care codifică proteina de fuziune conform oricăreia dintre revendicările 1-13.

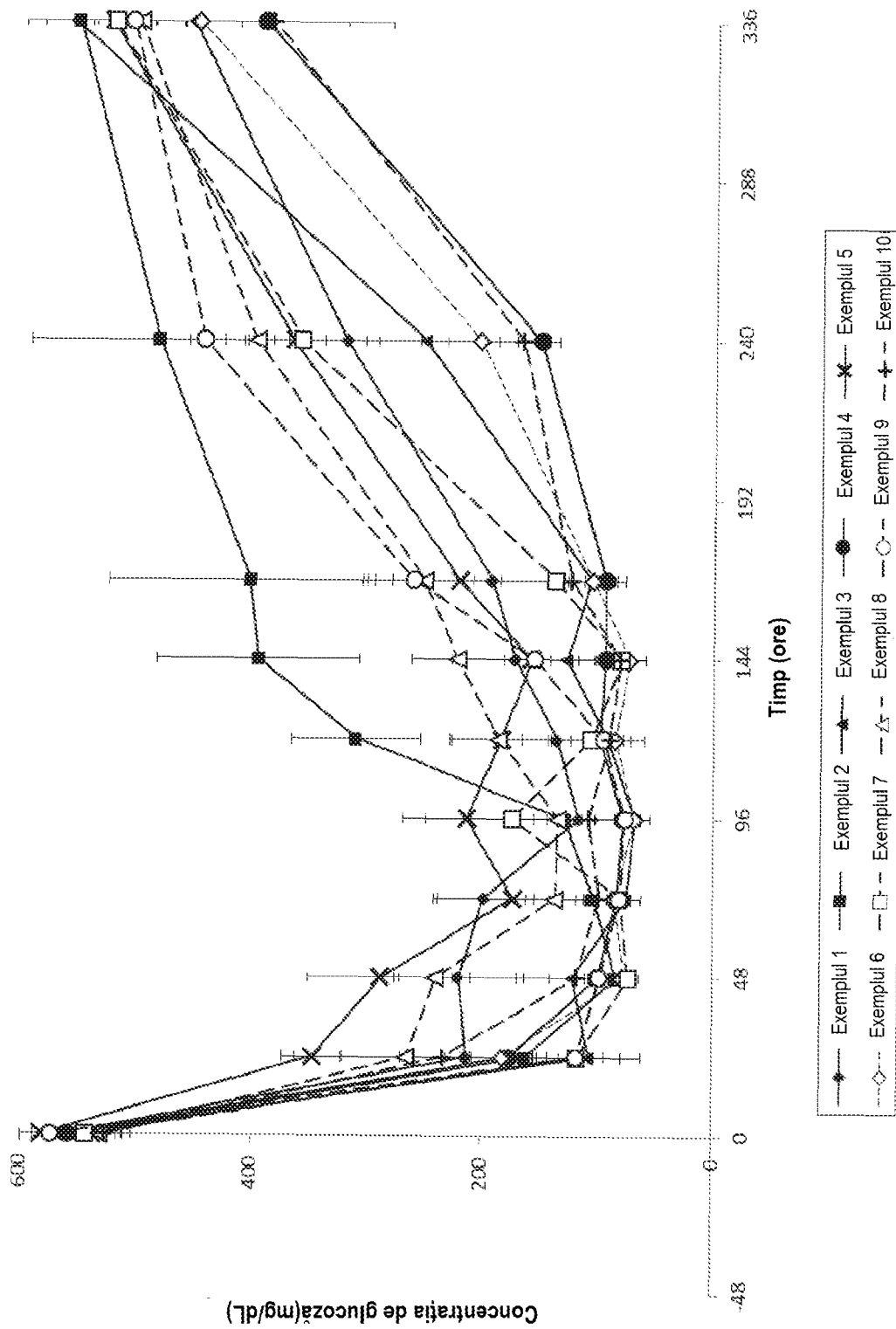
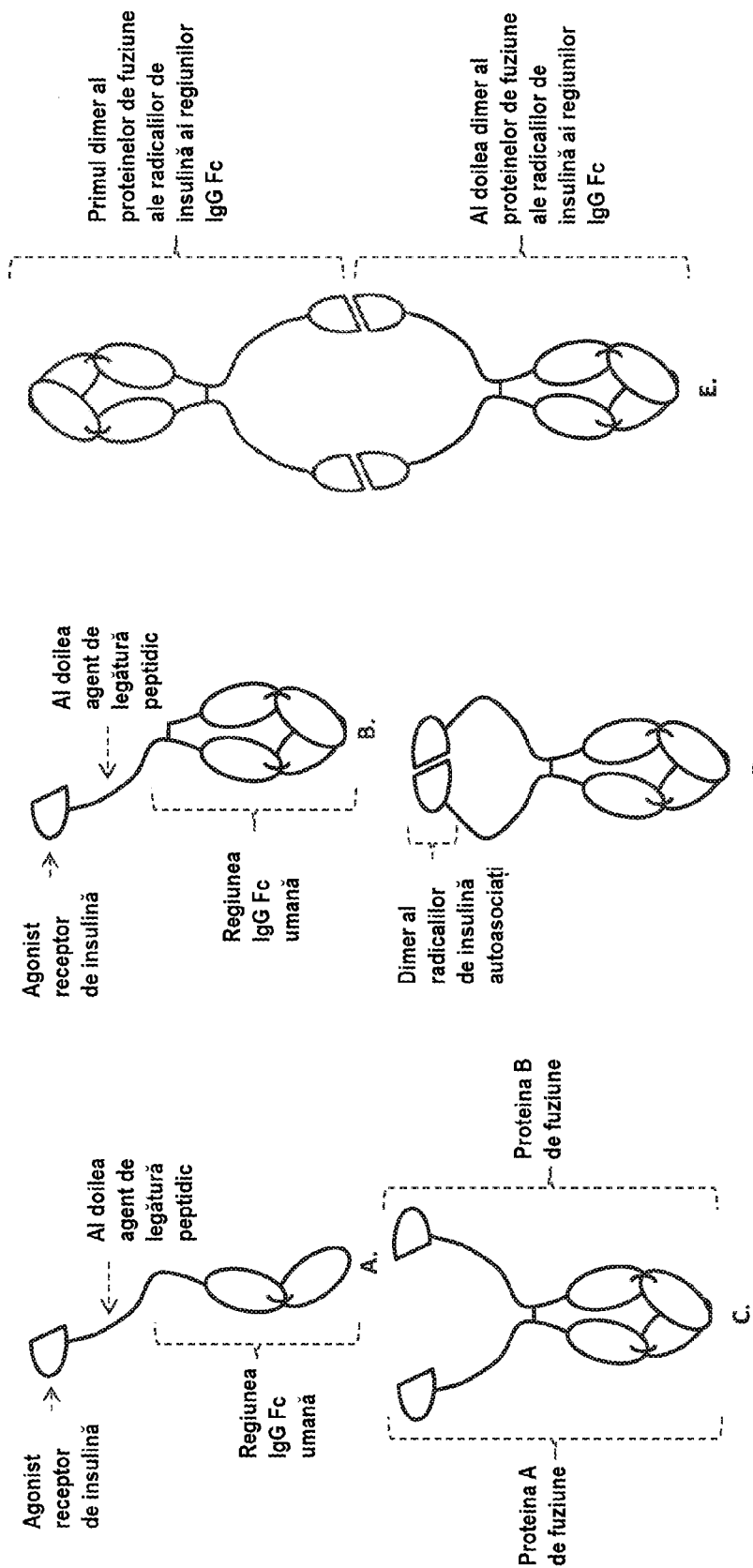


Fig. 1



Legendă:

- Proteină de fuziune în care regiunea IgG Fc umană cuprinde regiunea Fc dintr-un lanț greu.
- Proteină de fuziune în care regiunea IgG Fc umană cuprinde regiunea Fc din două lanțuri grele.
- Dimer a două proteine de fuziune.
- Dimer a două proteine de fuziune în care doi radicali de insulină s-au autoasociat sau dimerizat.
- Dimer a două proteine de fuziune în care doi radicali de insulină ai primului dimer al proteinei de fuziune s-au autoasociat sau dimerizat cu radicalii de insulină ai celui de al doilea dimer.