



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 011 770 T2** 2009.02.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 641 483 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 011 770.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2004/016611**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 753 440.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/110472**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.06.2004**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **23.12.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.04.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **13.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.02.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 38/17 (2006.01)**

**C12N 15/62 (2006.01)**

**C07K 14/47 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**477880 P 12.06.2003 US**

**570908 P 13.05.2004 US**

(73) Patentinhaber:

**Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US**

(74) Vertreter:

**Spott, Weinmiller & Böhm, 80336 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,  
SK, TR**

(72) Erfinder:

**GLAESNER, Wolfgang, Carmel, IN 46032, US;  
MILLICAN, Rohn Lee, Indianapolis, IN 46259, US;  
TIAN, Yu, Carmel, IN 46033, US; TSCHANG,  
Sheng-Hung Rainbow, Carmel, IN 46033, US;  
VICK, Andrew Mark, Fishers, IN 46037, US**

(54) Bezeichnung: **FUSIONSPROTEINE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft heterologe Fusionsproteine, die einen therapeutischen Peptidwirkstoff und einen konstanten Teil der schweren Kette eines Immunglobulins (Fc) umfassen, der die Wirkung hat, dass einer die in vivo Halbwertszeit des therapeutischen Peptidwirkstoffs verlängert. Diese heterologen Fusionsproteine können zur Behandlung von humanen Erkrankungen, wie auch einer Vielzahl an anderen Zuständen und Störungen verwendet werden.

**[0002]** Viele aktive therapeutische Peptide schauen in den klinischen Tests vielversprechend zur Behandlung verschiedener Erkrankungen aus. Jedoch war die Brauchbarkeit einer Therapie, die diese Peptide umfasst, dadurch limitiert, dass viele Peptide wenig aktiv sind, in vivo schnell geklärt werden oder in vivo extrem kurze Halbwertszeiten aufweisen. Es wurden verschiedene Ansätze unternommen, um die Eliminierungshalbwertszeit dieser Peptide zu verlängern oder die Clearance dieser Peptide aus dem Körper zu verringern, während die biologische Aktivität aufrechterhalten bleibt. Ein Ansatz umfasst die Fusion eines aktiven therapeutischen Peptids an den konstanten Teil der schweren Kette eines Immunglobulins (Fc). Immunglobuline weisen in vivo typischerweise lange Halbwertszeiten im Kreislauf auf. Beispielsweise haben IgG Moleküle eine Halbwertszeit beim Menschen von bis zu 23 Tagen. Der Fc Teil des Immunglobulins ist teilweise für diese in vivo Stabilität verantwortlich. Diese heterologen Fusionsproteine nutzen die Stabilität aus, die durch den Fc Teil eines Immunglobulins bereitgestellt wird, während sie die biologische Aktivität der Peptide konservieren.

**[0003]** Die WO 97 00 319 A beschreibt chimere Proteine, die Leptin oder eine Mutante oder Variante hiervon fusioniert an eine humane Immunglobulindomäne umfassen. Die WO 96 04 388 A beschreibt lösliche Proteine mit einer humanen Interleukin (IL4) und/oder humanen Interleukin 13 (IL13) Antagonist- oder partiellen Antagonistaktivität, die eine IL4 Mutante oder Variante fusioniert an zumindest eine humane, konstante Immunglobulindomäne oder ein Fragment hiervon umfassen. Die WO 28 267 A beschreibt Fusionsproteine, die ein Peptid mit CTLA4 Aktivität fusioniert an eine konstante Immunglobulinregion umfassen.

**[0004]** Obwohl dieser Ansatz für Peptidtherapeutika möglich ist (siehe beispielsweise WO 02 46 227, die heterologe Fusionsproteine beschreibt, die eine GLP-1 Verbindung und den Fc Teil eines Immunglobulins oder Analogons oder Fragments hiervon umfasst) besteht eine allgemeine Sorge bezüglich der Bildung eines halben Antikörpers, unerwünschter Effektorfunktion, Glykosylierungsstellen und einer heterogenen Expression.

**[0005]** Angal et al., Mol. Immun. 81993) 30 (1): 105–108 beschreibt, wie humanes Immunglobulin G4 (IgG4) in zwei molekularen Formen existiert: Dem H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> Tetramer und dem HL "Halbantikörper" aufgrund der Heterogenität der Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten. Es wurde festgestellt, dass eine einzelne Substitution eines Rests an der Position 241 (Kabatnummerierungssystem) zur Bildung eines homogenen Antikörpers führt. Reddy et al., J. Immun. (2000) 164: 1925–1933 beschreibt den monoklonalen CD4 Antikörper Clenoliximab, der ein modifiziertes IgG4 umfasst, das zwei Substitutionen einzelner Reste enthält, die so angelegt sind, dass sie die Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten stabilisieren und die restliche Fc Rezeptorbindung abgeschnitten wird.

**[0006]** Die vorliegende Erfindung versucht die Probleme zu überwinden, die oben durch die Identifizierung und Substitution von Aminosäuren an verschiedenen Positionen des Fc Teils des Moleküls beschrieben sind, welche halbe Antikörper reduzieren oder verringern oder die Effektorfunktion eliminieren. Zusätzlich liefert die vorliegende Erfindung auch die Identifizierung und Substitution von Aminosäuren an verschiedenen Positionen des Fc Teils des Moleküls, die keine Glykosylierungsstellen aufweisen und eine verringerte Heterogenität während der Expression liefern. Ferner ist es erwünscht, dass die Identifizierung und Substitution von Aminosäuren an verschiedenen Positionen des Fc Teils des Moleküls keine Immunreaktion nach einer wiederholten und verlängerten Verabreichung des heterologen Fusionsproteins induziert.

**[0007]** Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung umfassen heterologe Fusionsproteine, die ein aktives, therapeutisches Peptid umfassen, das an den Fc Teil eines Immunglobulins fusioniert ist, wobei der Fc Teil die Sequenz der SEQ ID Nr. 1 umfasst:

**Xaa<sub>1</sub>-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-  
Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-  
Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-  
Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-  
Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-  
Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-  
Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-  
Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-  
Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-  
Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-  
Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-  
Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-  
Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-  
Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-  
Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-  
Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa<sub>230</sub> (SEQ ID NO: 1)**

worin

Xaa an der Position 1 für Ala steht oder fehlt,  
Xaa an der Position 16 für Pro oder Glu,  
Xaa an der Position 17 für Val, oder Ala,  
Xaa an der Position 18 für Ala,  
Xaa an der Position 80 für Asn oder Ala steht, and  
Xaa an der Position 230 für Lys steht oder fehlt.

**[0008]** Der Peptidteil und der Fc Teil der vorliegenden Erfindung werden direkt oder über einen Linker aneinander fusioniert. Ein Beispiel für einen Linker ist ein G-reicher Peptidlinker mit der Sequenz Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2). Andere Beispiele für Linker umfassen unter anderem Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (1.5 L) (SEQ ID NO: 4), Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (2 L) (SEQ ID NO: 6), Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Asp-Ala-Ala-Ala-Arg-Glu-Ala-Ala-Ala-Arg-Asp-Ala-Ala-Ala-Lys (SEQ ID NO: 7) and Asn-Val-Asp-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg (SEQ ID NO: 8).

**[0009]** Der C-Terminus des Peptidteils und der N-Terminus des Fc Teils werden miteinander fusioniert. Alternativ dazu werden der N-Terminus des Peptidteils und der C-Terminus des Fc Teils miteinander fusioniert. Zusätzlich wird der C-Terminus des Peptidteils mit dem N-Terminus des Fc Teils fusioniert und der N-Terminus eines weiteren Peptidmoleküls wird mit dem C-Terminus des Fc Teils fusioniert, was zu einem Peptid-Fc-Peptid Fusionsprotein führt.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch Polynukleotide, einschließlich der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung, wie auch Vektoren und Wirtszellen, die solche Polynukleotide umfassen. Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können zur Behandlung von Patienten verwendet werden, die an humanen Erkrankungen leiden, wie auch an einer Vielzahl an deren Zuständen und Störungen.

**[0011]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung umfassen einen aktiven, therapeutischen

Peptidteil und einen Fc Teil. Der Fc Teil umfasst Substitutionen an die humane IgG4 Sequenz, die das heterologe Fusionsprotein bereitstellen, das die in vivo Stabilität im Vergleich zum aktiven therapeutischen Peptid erhöht, das nicht an die Fc Sequenz fusioniert ist.

**[0012]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung enthalten einen Fc Teil, der sich vom humanen IgG4 ableitet, umfassen aber insbesondere Substitutionen im Vergleich zur humanen Wildtypsequenz. Wie hierin verwendet hat der Fc Teil eines Immunglobulins die Bedeutung, die dem Ausdruck im Gebiet der Immunologie herkömmlich zugeordnet wird. Genauer gesagt bezieht sich der Ausdruck auf ein Antikörperfragment, das nicht die zwei Antigenbindungsregionen (die Fab Fragmente) vom Antikörper enthält. Der Fc Teil besteht aus der konstanten Region eines Antikörpers von beiden schweren Ketten, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen und Disulfidbrücken assoziieren. Der Fc Teil kann die Scharnierregionen enthalten und sich über die CH2 und CH3 Domänen zum C-Terminus des Antikörpers erstrecken. Der Fc Teil kann ferner eine oder mehrere Glykosylierungsstellen umfassen.

**[0013]** Es gibt 5 Typen humaner Immunglobuline mit unterschiedlichen Effektorfunktionen und pharmakokinetischen Eigenschaften. IgG ist das stabilste der fünf Typen mit einer Serumhalbwertszeit von etwa 23 Tagen. Es gibt 4 IgG Subklassen (G1, G2, G3 und G4), die jeweils unterschiedliche Funktionen haben, welche als Effektorfunktionen bekannt sind. Diese Effektorfunktionen werden allgemein durch die Wechselwirkung mit dem Fc gamma Rezeptor (FcγR) oder durch Bindung einer Subkomponente des Komplements 1 (C1q) vermittelt, das die schwere Kette von Immunglobulin G oder Immunglobulin M erkennt und bindet und den klassischen Komplementweg initiiert. Die Bindung an FcγR kann zu einer Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Cytolyse führen, während die Bindung an die Komplementfaktoren zu einer durch Komplement vermittelten Lyse führen kann. Bei dem Entwurf von heterologen Fusionsproteinen, worin der Fc Teil allein für die Fähigkeit zur Ausdehnung der Halbwertszeit verwendet wird, ist es wichtig, jede Effektorfunktion zu minimieren. Daher leiten sich die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung von der humanen IgG4 Fc Region ab, da diese eine verringerte Fähigkeit zur Bindung von FcγR und den Komplementfaktoren im Vergleich zu anderen IgG Subtypen aufweist. Von IgG4 wurde jedoch gezeigt, dass es Zielzellen beim Menschen dezimiert [Issacs et al., (1996) Clin. Exp. Immunol. 106: 427–433]. Da die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung Zellen in verschiedenen Organen des Körpers angehen, könnte die Verwendung einer von IgG4 stammenden Region in einem heterologen Fusionsprotein eine Immunantwort gegen die Zellen über eine Wechselwirkung des heterologen Fusionsproteins mit den auf den Zielzellen vorhandenen Rezeptoren auslösen. Daher enthält die IgG4 Fc Region, die Teil der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung ist, Substitutionen, die die Effektorfunktion eliminieren. Der IgG4 Fc Teil der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung enthält die folgenden Substitutionen: Alanin oder Valin anstelle von Phenylalanin am Rest 234 und Alanin anstelle von Leucin am Rest 235 (EU Nummerierung, E. A. Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Ausgabe, Herausgeber US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Veröffentlichung Nr. 91-3242). Zusätzlich kann Prolin anstelle von Glutamat am Rest 233 verwendet werden. Die Reste 233, 234 und 235 entsprechenden Position 16, 17 und 18 in SEQ ID Nr. 1. Ferner ist die Entfernung der N-gebundenen Glykosylierungsstelle in der IgG4 Fc Region durch die Substitution von Asn durch Ala am Rest 297 (EU Nummerierung), was der Position 80 der SEQ ID Nr. 1 entspricht, ein weiterer Weg um sicherzustellen, dass die restliche Effektoraktivität im Zusammenhang mit einem heterologen Fusionsprotein eliminiert wird.

**[0014]** Zusätzlich enthält der IgG4 Fc Teil der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung eine Substitution, die die Dimerbildung der schweren Kette stabilisiert und die Bildung von halben IgG4 Fc Ketten verhindert. Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung existieren vorzugsweise als Dimere, die über Disulfidbindungen und verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden sind. Wildtyp IgG4 enthält ein Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys (SQ ID Nr. 3) Motiv, das am Rest 224 (EU Nummerierung) beginnt. Dieses Motiv in einer einzelnen, aktiven, therapeutischen Peptid-Fc-Kette bildet Disulfidbrücken mit dem entsprechenden Motiv in einer weiteren aktiven, therapeutischen Peptid-Fc-Kette. Jedoch verursacht die Anwesenheit von Serin im Motiv die Bildung von einkettigen, heterologen Fusionsproteinen. Die vorliegende Erfindung umfasst heterologe Fusionsproteine, worin die IgG4 Sequenz weiter so modifiziert wird, dass das Serin an der Position 228 (EU Nummerierung) durch Prolin substituiert ist (Aminosäurerest 11 in SEQ ID Nr. 1).

**[0015]** Der C-terminale Lysinrest, der im nativen Molekül vorkommt, kann im Fc Teil des IgG4 Derivats der hierin diskutierten heterologen Fusionsproteine deletiert sein (Position 230 der SEQ ID nr. 1, wobei das deletierte Lysin als Des-K bezeichnet wird). Heterologe Fusionsproteine, die in einigen Zelltypen exprimiert werden (wie NS0 Zellen), worin das Lysin durch das C-terminale Kodon kodiert wird, sind dadurch heterolog, dass ein Teil der Moleküle das Lysin als C-terminale Aminosäure aufweist und bei einem Teil das Lysin deletiert ist. Die Deletion kommt durch die Proteasewirkung während der Expression in einigen Säugerzelltypen zustande. Um

diese Heterogenität zu vermeiden, ist es bevorzugt, dass dem heterologen Fusionsexpressionskonstrukt ein C-terminales Codon für Lysin fehlt.

**[0016]** Es ist bevorzugt, dass die C-terminale Aminosäure des aktiven therapeutischen Peptidteils mit dem N-Terminus des IgG4 Fc Analogteils über einen Glycin-reichen Linker fusioniert ist. Die in vivo Funktion und Stabilität der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung kann durch die Anfügung von kleinen Peptidlinkern optimiert werden, um potentiell unerwünschte Domänenwechselwirkungen zu vermeiden. Ferner liefert ein Glycin-reicher Linker eine strukturelle Flexibilität, so dass der aktive therapeutische Peptidteil produktiv mit dem Rezeptor auf die Zielzellen wirken kann. Diese Linker können jedoch signifikant das Risiko erhöhen, dass das heterologe Fusionsprotein in vivo immunogen ist. Daher ist es bevorzugt, dass die Länge nicht länger als notwendig ist, um unerwünschte Domänenwechselwirkungen zu vermeiden und/oder die biologische Aktivität und/oder Stabilität zu optimieren. Der bevorzugte Glycin-reiche Linker umfasst die Sequenz: Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID Nr. 2). Obwohl mehrere Kopien dieses Linkers in den heterologen Fusionsproteinen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, ist es bevorzugt, dass eine einzelne Kopie dieses Linkers verwendet werden kann, um das Risiko der Immunogenität zu minimieren, das mit einer längeren und wiederholten Verabreichung assoziiert ist.

**[0017]** Ein aktives, therapeutisches Peptid kann ohne Beschränkung ein Enzym, ein Enzyminhibitor, ein Antigen, ein Antikörper, ein Hormon, ein Faktor, der bei der Kontrolle der Gerinnung beteiligt ist, ein Interferon, ein Cytokin, ein Wachstumsfaktor und/oder Differenzierungsfaktor, ein Faktor, der bei der Erzeugung/Resorption von Knochengewebe beteiligt ist, ein Faktor, der bei der zellulären Motilität oder Migration beteiligt ist, ein bakterizider oder antifungaler Faktor, ein chemotaktischer Faktor, ein cytostatischer Faktor, ein Plasma- oder interstitielles Adhäsionsmolekül oder extrazelluläre Matrices oder alternativ dazu jede Peptidsequenz sein, die ein Antagonist oder Agonist der molekularen und/oder interzellulären Wechselwirkungen ist, die in den Pathologien der zirkulären und interstitiellen Kompartimente beteiligt sind, beispielsweise der Bildung von arteriellen und venösen Thromben, Krebsmetastasen, Tumorangiogenese, entzündlichem Schock, Autoimmunerkrankungen, Knochen- und Osteoartikulärpathologien und dergleichen. Beispiele für aktive, therapeutische Peptide umfassen unter anderem G-CSF, GM-CSF, Eosinophilen(EOS)-CSF, Makrophagen(M)-CSF, Multi-CSF, Erythropoetin (EPO), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, c-Kit Ligand, Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) 21, Stammzellfaktor (SCF), Mastzellwachstumsfaktor, Erythroid-potenzierende Aktivität (EPA), Lactoferrin (LF), Ferritin H-Untereinheit (das heißt saures Isoferritin), Prostaglandin (PG) E1 und E2, Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  und  $\beta$  (das heißt Lymphotoxin), Interferon (IFN)  $\alpha$  (1b, 2a und 2b),  $\beta$ ,  $\omega$  und  $\gamma$ , transformierender Wachstumsfaktor(TGF)- $\beta$ , Aktivin, Inhibin, Leukämiehemmfaktor, Oncostatin M, Makrophageninflammationsprotein (MIP) 1 $\alpha$  (das heißt Stammzellinhibitor), Makrophageninflammationsprotein(MIP)-1 $\beta$ , Makrophageninflammationsprotein(MIP)-2 $\alpha$  (das heißt GRO- $\beta$ ), GRO- $\alpha$ , MIP-2- $\beta$  (das heißt GRO- $\gamma$ ), Blutplättchenfaktor 4, chemotaktischer und aktivierender Faktor für Makrophagen, IP-10, Calcitonin, Wachstumshormon, PTH, TR6, BLYS, BLYS Einkettenantikörper, Resistin, Wachstumshormon freisetzender Faktor, VEGF-2, KGF-2, DSLAM, KDI, TR2, Glucagon-ähnliches Peptid 1 (GLP-1), Exendin 4 und Neuropeptidhypophysenadenylatcyclase-aktivierendes Polypeptid (PACAP) oder einer der Rezeptoren PAC-1, VPAC-1 oder VPAC-2 oder aktive Analoge, Fragmente oder Derivate eines der vorher erwähnten Peptide.

**[0018]** Die Nomenklatur, die hierin zur Bezeichnung spezifischer, heterologer Fusionsproteine verwendet wird, wird folgendermaßen definiert: L bezieht sich auf einen Linker mit der Sequenz Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID Nr. 2). Die Nummer unmittelbar vor dem L bezieht sich auf die Anzahl an Linkern, die den aktiven, therapeutischen Peptidteil vom Fc Teil trennen. Ein Linker der als 1.5 L angegeben ist, bezieht sich auf die Sequenz Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID Nr. 4). Ein Linker, der als 2 L angegeben ist, bezieht sich auf die Sequenz Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID Nr. 6). IgG4 bezieht sich auf ein Analogon der humanen IgG4 Fc Sequenz, die als SEQ ID Nr. 1 angegeben ist. Substitutionen im IgG4 Fc Teil des heterologen Fusionsproteins sind in Klammern angegeben. Die Wildtypamino-säure wird durch die herkömmliche Abkürzung angegeben, gefolgt von der Position im Zusammenhang der gesamten IgG4 Sequenz unter Verwendung des EU Nummerierungssystems, gefolgt von der Aminosäure, die an der Position durch ihre Abkürzung angegeben ist.

**[0019]** Obwohl heterologe Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung durch verschiedene Verfahren hergestellt werden können sind aufgrund der Größe des heterologen Fusionsproteins rekombinante Verfahren bevorzugt. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung, wie sie hierin beschrieben und beansprucht wird, werden die folgenden allgemeinen Molekularbiologieausdrücke und Abkürzungen im folgenden definiert.

**[0020]** "Basenpaar" oder "bp", wie es hierin verwendet wird, bezieht sich auf DNA oder RNA. Die Abkürzungen A, C, G und T entsprechen jeweils den 5'-Monophosphatformen der Desoxyribonukleotide (Desoxyadenosin, Desoxycytidin, Desoxyguanosin und Thymin), wenn sie in DNA Molekülen vorkommen. Die Abkürzungen U, C, G und A entsprechen jeweils den 5'-Monophosphatformen der Ribonukleotide Uridin, Cytidin, Guanosin und Adenosin, wenn sie in RNA Molekülen vorkommen. In einer doppelsträngigen DNA kann sich Basenpaar auf die Partnerschaft von A mit T oder C mit G beziehen. In einem DNA/RNA Heteroduplex kann sich Basenpaar auf eine Partnerschaft von A mit U oder C mit G beziehen. (Siehe obige Definition von "komplementär").

**[0021]** "Verdau" oder "Restriktion" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym, das nur an bestimmten Sequenzen in der DNA wirkt ("sequenzspezifische Endonukleasen"). Die verschiedenen Restriktionsenzyme, die hierin verwendet werden, sind im Handel erhältlich und ihre Reaktionsbedingungen, Cofaktoren und andere Erfordernisse werden verwendet, wie wenn sie dem Fachmann bekannt sind. Geeignete Puffer und Substratmengen für bestimmte Restriktionsenzyme werden durch den Hersteller angegeben oder können leicht in der Literatur gefunden werden. "Ligation" bezieht sich auf das Verfahren zur Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei doppelsträngigen Nukleinsäurefragmenten. Falls nichts anderes angegeben ist, kann die Ligation unter Verwendung bekannter Puffer und Zustände mit DNA Ligase, wie T4 DNA Ligase, erreicht werden.

**[0022]** "Plasmid" bezieht sich auf ein extrachromosomales (gewöhnlich) selbstreplizierendes, genetisches Element.

**[0023]** "Rekombinanter DNA Klonierungsvektor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf jedes autonom replizierende Mittel, wie unter anderem Plasmide und Phagen, die ein DNA Molekül umfassen, in das ein oder mehrere zusätzliche DNA Segmente angefügt werden können oder wurden.

**[0024]** "Rekombinanter DNA Expressionsvektor" bezieht sich, wie er hierin verwendet wird, auf jeden rekombinanten DNA Klonierungsvektor, worin ein Promotor zur Kontrolle der Transkription der eingebauten DNA eingebaut wurde.

**[0025]** "Transkription" bezieht sich auf das Verfahren, worin Information, die in einer Nukleotidsequenz an DNA enthalten ist, in eine komplementäre RNA Sequenz überführt wird.

**[0026]** "Transfektion" bezieht sich auf die Aufnahme eines Expressionsvektors durch eine Wirtszelle unabhängig davon, ob kodierende Sequenzen tatsächlich exprimiert werden. Es sind mehrere Transfektionsverfahren dem Fachmann bekannt, beispielsweise Calciumphosphat Co-Fällung, Liposomentransfektion und Elektroporation. Erfolgreiche Transfektion wird im allgemeinen erkannt, wenn ein Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des Vektors in der Wirtszelle auftritt.

**[0027]** "Transformation" bezieht sich auf die Einführung von DNA in einen Organismus, so dass die DNA entweder als extrachromosomales Element oder durch chromosomale Integration replizierbar ist. Verfahren zur Transformation von bakteriellen und eukaryontischen Wirten sind in der Technik gut bekannt, wie Kerninjektion, Protoplastenfusion oder durch Calciumbehandlung unter Verwendung von Calciumchlorid sind in J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) zusammengefasst. Allgemein wird der Ausdruck Transformation anstelle des Ausdrucks Transfektion verwendet, wenn DNA in Hefe eingeführt wird.

**[0028]** "Translation" bezieht sich, wie sie hierin verwendet wird, auf ein Verfahren, worin die genetische Information der Boten RNA (mRNA) verwendet wird, um die Synthese einer Polypeptidkette zu spezifizieren und steuern.

**[0029]** "Vektor" bezieht sich auf eine Nukleinsäureverbindung, die zur Transfektion und/oder Transformation von Zellen bei der Genmanipulation verwendet wird, welche Polynukleotidsequenzen trägt, die geeigneten Proteinmolekülen entspricht, die bei einer Kombination mit geeigneten Kontrollsequenzen, der zu transfizierenden/transformierenden Wirtszelle spezifische Eigenschaften verleiht. Plasmide, Viren und Bakteriophagen sind geeignete Vektoren. Künstliche Vektoren werden durch Scheiden und Verbinden von DNA Molekülen aus unterschiedlichen Quellen unter Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen konstruiert. Der Ausdruck "Vektor", wie er hierin verwendet wird, umfasst rekombinante DNA Klonierungsvektoren und rekombinante DNA Expressionsvektoren.

**[0030]** "Komplementär" oder "Komplementarität" bezieht sich, wie sie hierin verwendet wird, auf Basenpaare

(Purine und Pyrimidine), die über eine Wasserstoffbindung in einer doppelsträngigen Nukleinsäure assoziieren. Die folgenden Basenpaare sind komplementär: Guanin und Cytosin, Adenin und Thymin und Adenin und Uracil.

**[0031]** "Primer" bezieht sich auf ein Nukleinsäurefragment, das als initiiertes Substrat für eine enzymatische oder synthetische Elongation wirkt.

**[0032]** "Promotor" bezieht sich auf eine DNA Sequenz, die eine Transkription von DNA zu RNA steuert.

**[0033]** "Sonde" bezieht sich auf eine Nukleinsäureverbindung oder ein Fragment hiervon, das mit einer anderen Nukleinsäureverbindung hybridisiert.

**[0034]** "Singelsequenz" bezieht sich auf eine Sequenz an Aminosäuren, die enzymatisch oder chemisch unter Bildung des gewünschten Polypeptids von Interesse entfernt werden können.

**[0035]** "Sekretionssignalsequenz" bezieht sich auf eine Sequenz an Aminosäuren, die im allgemeinen an der N-terminalen Region eines größeren Polypeptids vorkommt und deren Funktion die Initiation der Assoziation des Polypeptids mit den Zellmembrankompartimenten, wie endoplasmatisches Reticulum und Sekretion des Polypeptids durch die Plasmamembran ist.

**[0036]** Humane IgG4 Wildtypproteine können aus einer Vielzahl an Quellen erhalten werden. Beispielsweise können diese Proteine aus einer cDNA Bank erhalten werden, die aus Zellen hergestellt wird, welche die mRNA von Interesse an einem detektierbaren Niveau exprimieren. Genbanken können mit Sonden gescreent werden, die unter Verwendung der veröffentlichten DNA oder Proteinsequenzen für das bestimmte Protein von Interesse entworfen wurden. Beispielsweise sind konstante Regionen der leichten oder schweren Kette des Immunglobulins beschrieben in Adams et al., (1980) *Biochemistry* 19: 2711–2719, Goughet et al. (1980) *Biochemistry* 19: 2802–2710, Dolby et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6027–6031, Rice et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7862–7862, Falkner et al. (1982) *Nature* 298: 286–288 und Morrison et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2: 239–256 beschrieben.

**[0037]** Das Screenen einer cDNA oder genomischen Bank mit der ausgewählten Sonde kann mittels Standardverfahren ausgeführt werden, wie sie in Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989) beschrieben sind. Ein alternatives Verfahren zur Isolierung eines Gens, das für ein Immunglobulinprotein kodiert, ist die Verwendung der PCR Methodik [Sambrook et al., siehe obige Literaturstelle, Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)]. PCR Primer können auf der Grundlage veröffentlichter Sequenzen entworfen werden.

**[0038]** Im allgemeinen können die Vollängenwildtypsequenzen, die aus einer bestimmten Genbank kloniert wurden, als Matrize zur Erzeugung der IgG4 Fc Analogonfragmente der vorliegenden Erfindung dienen, die die Fähigkeit behalten, dem aktiven, therapeutischen Peptid eine längere Plasmahalbwertszeit zu verleihen, das Teil des heterologen Fusionsproteins ist. Die IgG4 Fc Analogfragmente können unter Verwendung von PCR Techniken mit Primern hergestellt werden, die entworfen wurden, um an Sequenzen zu hybridisieren, die den gewünschten Enden des Fragments entsprechen. Die PCR Primer können auch so entworfen werden, dass sie Restriktionsenzymstellen erzeugen, um die Klonierung in Expressionsvektoren zu erleichtern.

**[0039]** DNA, die die aktiven therapeutischen Peptide der vorliegenden Erfindung kodiert, kann auf eine Vielzahl an unterschiedlichen Verfahren hergestellt werden, einschließlich Klonierungsmethoden, wie denen, die oben beschrieben sind, wie auch chemisch synthetisierte DNA. Die chemische Synthese kann attraktiv sein, wenn das kodierte Peptid kurz ist. Die Aminosäuresequenz für die aktiven, therapeutischen Peptide sind im allgemeinen bekannt und veröffentlicht (Lopez et al., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 80: 5485–5489, Bell et al., (1983), *Nature*, 302: 716–718, G. Heinrich et al. (1984) *Endocrinol.*, 115: 2176–281, M. Ghiglione et al. (1984) *Diabetologia* 27: 599–600].

**[0040]** Das für ein heterologes Fusionsprotein kodierende Gen kann dann durch die Ligation der DNA, die für ein aktives, therapeutisches Protein kodiert, im Leserahmen zur DNA konstruiert werden, die für die hierin beschriebenen IgG Fc Proteine kodiert. Die DNA, die für ein aktives, therapeutisches Protein und IgG Fc Fragmente kodiert, kann entweder vor der Ligation oder im Zusammenhang mit einer cDNA mutiert werden, die für ein vollständiges, heterologes Fusionsprotein kodiert. Es sind eine Vielzahl an Mutagenesetechniken in der Technik gut bekannt. Das Gen, das für das aktive, therapeutische Protein kodiert und das Gen, das für das IgG4 Fc Analogprotein kodiert, können auch im Leserahmen durch eine DNA zusammengebracht werden, die

für ein G-reiches Linkerpeptid kodiert. Ein Beispiel für eine DNA Sequenz, die für eines der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung kodiert, nämlich Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, Des K) wird als SEQ ID nr. 5 bereitgestellt:

```
CACGGCGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCTCCTATCTCGAGGAGCAGG
CCGCCAAGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCGGCGGCGGTGGTGGTGG
CTCCGGAGGGCGGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGCGCTGAGTCCAAATAATGGT
CCCCCATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTT
CCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA
CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
CCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAIGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT (SEQ ID NO:5)
```

**[0041]** Die Wirtszellen werden mit Expressions- oder Klonierungsvektoren, die hierin für heterologe Fusionsproteinproduktion beschrieben sind, transfiziert oder transformiert und in Nährmedien kultiviert, die die zur Induktion von Promotoren, Selektion von Transformanden oder Amplifikation der Gene geeignet sind, die für die gewünschten Sequenzen kodieren. Die Kulturbedingungen, wie Medien, Temperatur, pH und dergleichen können durch den Fachmann mit einfachen Experimenten selektiert werden. Im allgemeinen können Prinzipien, Protokolle und praktische Techniken zur Maximierung der Produktivität der Zellkulturen in Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, Herausgeber (IRL Press, 1991) und Sambrook et al., siehe obige Literaturstelle gefunden werden. Verfahren zur Transfektion sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise CaPO<sub>4</sub> und Elektroporation. Allgemeine Aspekte der Transformation von Säugerzellwirtssystemen wurden in US Nr. 4 399 216 A beschrieben. Transformationen in Hefen werden typischerweise gemäß dem Verfahren von Solingen et al., J. Bad. 130 (2): 946–947 (1977) und Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (8): 3829–3833 (1979) ausgeführt. Jedoch können auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen verwendet werden, wie Kernmikroinjektion, Elektroporation, bakterielle Protoplastenfusion mit intakten Zellen oder Polykationen, beispielsweise Polybren oder Polyomethin. Für verschiedene Techniken zur Transformation von Säugerzellen siehe Keown et al., Methods in Enzymology 185: 527–537 (1990) und Mansour et al., Nature 336 (6197): 348–352 (1988).

**[0042]** Geeignete Wirtszellen zur Klonierungs- oder Expression der Nukleinsäure (beispielsweise DNA) in den Vektoren hierin umfassen Hefe oder höhere Eukaryontenzellen.

**[0043]** Eukaryontische Mikroben, wie filamentöse Pilze oder Hefe sind geeignete Klonierungs- oder Expressionswirte für heterologe Fusionsproteinvektoren. *Saccharomyces cerevisiae* ist ein herkömmlich verwendeter Wirtsorganismus der niederen Eukaryonten. Andere umfassen *Schizosaccharomyces pombe* [Beach und Nurse, nature, 290: 140–143 (1981), EP 0 139 383 A vom 2. Mai 1995], *Muyveromyces* Wirte [US 4 943 529 A, Fler et al., Bio/Technology 9 (10): 968–975 (1991)], wie beispielsweise *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574) [de Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154 (2): 737–742 (1983)], *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16 045), *K. wickeramii* (ATCC 24 178), *K. waltii* (ATCC 56 500), *K. drosophilorum* (ATCC 36 906) [Van den Berg et al., BiolTechnology 8 (2): 135–9 (1990)], *K. thermotolerans*, und *K. marxianus*, *yarrowia* (EP 402,226), *Pichia pastoris* (EP 183,070) [Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28 (4): 265–78 (1988)], *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244,234), *Neurospora crassa* [Case, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (10): 5259–63 (1979)], *Schwanniomyces* wie *Schwanniomyces occidentulis* (EP 0 394 538 A vom 31. Oktober 1990) und fi-

lamentöse Pilze, wie beispielsweise Neurospora, Penicillium, Tolypocladium (WO 91 00 357 A vom 10. Januar 1991) und Aspergillus Wirte, wie *A. nidulans* [Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 112 (1): 284–289 (1983)], Tilburn, et al., Gene 26 (2–3): 205–221 (1983), Yelton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (5): 1470–1474 (1984)] und *A. niger* [Kelly und Hynes, EMBO J. 4 (2): 475–479 (1985)]. Methylotrophe Hefen werden aus der Gattung ausgewählt, die besteht aus Hansenula, Candida, Klöckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis und Rhodotoruia. Eine Liste der spezifischen Spezies, die für diese Klasse beispielhaft sind, können gefunden werden in C. Antony, The Biochemistry of Methylotrophs 269 (1982).

**[0044]** Geeignete Wirtszellen zur Expression der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung werden von multizellulären Organismen abgeleitet. Beispiele für Nichtvertebratenzellen umfassen Insektenzellen, wie *Drosophila S2* und *Spodoptera Sp.*, *Spodoptera high 5*, wie auch Pflanzenzellen. Beispiele für brauchbare Wirtszelllinien umfassen NSO Myelomzellen, Chinesische Hamsterovar (CHO), SP2 und COS Zellen. Spezifischere Beispiele umfassen die Affennierenlinie CV1, die durch SV40 transformiert ist (COS-7, ATCC CRL 1651), humane, embryonale Nierenlinie [293 oder 293 Zellen, die für ein Wachstum in Suspensionskultur subkloniert sind, Graham et al., J. gen. Virol., 36 81): 59–74 (1977)], Chinesische Hamsterovazellen/DHFR [CHO, Urlaub und Chasin, Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 77 (7): 4210–4220 (1980)], Maussertolizellen [TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 81): 243–252 (1980)], humane Lungenzellen (W138. ATCC CCL 75), humane Leberzellen (Hep G2, HB 8065) und Mausbrusttumor (MMT 060562, ATCC CCL51). Eine bevorzugte Zelllinie zur Herstellung der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung ist die NSO Myelomzelllinie, die von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Katalognummer 85110503) erhältlich ist und in G. Galfre und C. Milstein ((1981) Methods in Enzymology 73 (13): 3–46 und Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures, Academic Press, N. Y., N. Y.) beschrieben ist.

**[0045]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können direkt rekombinant oder als Protein mit einer Signalsequenz oder anderen zusätzlichen Sequenzen hergestellt werden, die eine spezifische Spaltstelle am N-Terminus des reifen, heterologen Fusionsproteins erzeugen. Im allgemeinen kann die Signalsequenz eine Komponente des Vektors sein oder kann Teil der für das heterologe Fusionsprotein kodierenden DNA sein, die in den Vektor inseriert ist. Für die Sekretion in der Hefe kann die Signalsequenz beispielsweise die Invertasesignalsequenz der Hefe, die Signalsequenz des alpha Faktors (einschließlich *Saccharomyces* und *Kluyveromyces cc-Faktor* Signalsequenzen, wobei die letzteren in US 5 010 182 A beschrieben sind) oder die Signalsequenz der sauren Phosphatase, die Signalsequenz der *C. albicans* Glucoamylase (EP 0 363 179 A) oder die Signalsequenz sein, die in WO 90 13 646 A beschrieben ist. Bei der Säugerzellexpression können Säugersignalsequenzen zur Steuerung der Sekretion des Proteins verwendet werden, wie Signalsequenzen aus sekretierten Polypeptiden derselben oder verwandten Spezies wie auch virale Sekretionssignalsequenzen.

**[0046]** Sowohl Expressions- als auch Klonierungsvektoren enthalten eine Nukleinsäuresequenz, die es dem Vektor ermöglicht, in einer oder mehreren ausgewählten Wirtszellen zu replizieren. Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten typischerweise ein Selektionsgen, das auch Selektionsmarker genannt wird. Typische Selektionsgene kodieren Proteine, die (a) eine Resistenz gegenüber Antibiotika oder anderen Toxinen verleihen, beispielsweise Neomycin, Methotrexat oder Tetracyclin, (b) autotrophe Defizienzen komplementieren oder (c) entscheidende Nährstoffe liefern, die nicht aus komplexem Medium verfügbar sind, beispielsweise das Gen, das für die D-Alaninrazemase von *Bacillen* kodiert.

**[0047]** Beispiele für geeignete Selektionsmarker für Säugerzellen sind jene, die die Identifizierung von Zellen erlauben, welche zur Aufnahme der für das heterologe Fusionsprotein kodierenden Nukleinsäure kompetent sind, wie DHFR oder Thymidinkinase. Eine geeignete Wirtszelle ist, wenn das Wildtyp DHFR verwendet wird, die CHO Zelllinie, die bezüglich der DHFR Aktivität defizient ist, welche hergestellt und vermehrt wird, wie dies beschrieben ist [Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (7): 4216–4220 (1980)]. Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das *trp1* Gen, das im Hefepiasmid YRp7 vorkommt [Stinchcomb, et al., Nature 282 (5734): 39–43 (1979); Kingsman, et al., Gene 7 (2): 141–52 (1979); Tschumper, et al., Gene 10 (2): 157–66 (1980)]. The *trp1* Gen liefert einen Selektionsmarker für einen mutierten Stamm der Hefen dem die Fähigkeit zum Wachsen in Tryptophan fehlt, beispielsweise, ATCC Nr. 44076 oder PEPC1 [Jones, Genetics 85: 23–33 (1977)].

**[0048]** Die Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten gewöhnlich einen Promotor, der funktionsfähig an die für das heterologe Fusionsprotein kodierende Nukleinsäure gebunden ist, um die mRNA Synthese zu steuern. Es sind Promotoren für eine große Vielzahl an potenziellen Wirtszellen bekannt. Beispiele für geeignete Promotorsequenzen zur Verwendung mit den Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase [Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (24): 12073–12080 (1980)] oder andere glykolytische Enzymne

(Ness et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149 (1968), Holland, Biochemistry 17 (23): 4900–4907 (1978)], wie Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofruktokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glukokinase. Andere Hefepromotoren, die induzierbare Promotoren sind und den zusätzlichen Vorteil der durch die Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription aufweisen, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, Abbauenzyme, die mit dem Stickstoffmetabolismus assoziiert sind, Metallothionin, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Enzyme, die für Maltose und Galactoseverwertung verantwortlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefeexpression sind ferner in EP 0 073 657 A beschrieben. Die Transkription der für das heterologe Fusionsprotein kodierenden mRNA von Vektoren in Säugerzellen kann beispielsweise durch Promotoren kontrolliert werden, die aus den Genomen von Viren erhalten wurden, wie Polyomavirus, Geflügelpockenvirus, Adenovirus (wie Adenovirus 2), Rinderpapillomavirus, Vogelsarkomvirus, einem Retrovirus, Hepatitis-B-Virus und Simian Virus 40 (SV 40), aus heterologen Säugerpromotoren, beispielsweise dem Actinpromotor oder einem Immunglobulinpromotor und von Hitzeschockpromotoren, mit der Maßgabe, dass sie mit den Wirtszellsystemen kompatibel sind.

**[0049]** Die Transkription eines Polynukleotids, das für ein heterologes Fusionsprotein kodiert, durch höhere Eukaryonten, kann durch die Insertion einer Enhancersequenz in den Vektor erhöht werden. Enhancer sind cis-wirkende DNA Elemente mit gewöhnlich 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor zur Erhöhung der Transkription wirken. Viele Enhancersequenzen sind aus Säurgergenen bekannt (Globin, Elastase, Albumin,  $\alpha$ -Keto protein und Insulin). Typischerweise verwendet man einen Enhancer aus einem Virus für eine eukaryontische Zelle. Beispiele umfassen SV40 Enhancer und die späte Seite des Replikationsursprungs (bp 100 bis 270), den Enhancer des frühen Cytomegalieviruspromotors, den Enhancer der späten Seite des Replikationsursprungs von Polyoma und Adenovirus Enhancer. Die Enhancer können in den Vektor an einer Position 5' oder 3' der für das heterologe Fusionsprotein kodierenden Sequenz gespliced werden, sind aber vorzugsweise an einer Stelle 5' vom Promotor lokalisiert.

**[0050]** Expressionsvektoren, die in eukaryontischen Wirtszellen verwendet werden (Hefe, Pilze, Insekten, Pflanzen, Tiere, Menschen oder kernhaltige Zellen von anderen multizellulären Organismen) enthalten auch Sequenzen, die für die Termination der Transkription und zur Stabilisierung der mRNA erforderlich sind. Solche Sequenzen sind herkömmlich von untranslatierten 5' und manchmal 3' Regionen eukaryontischer oder viraler DNAs oder cDNAs erhältlich. Diese Regionen enthalten Nukleotidsegmente, die als polyadenylierte Fragmente im untranslatierten Teil der mRNA transkribiert werden, die für das heterologe Fusionsprotein kodiert.

**[0051]** Verschiedene Formen eines heterologen Fusionsproteins können aus einem Kulturmedium oder aus Wirtszelllysaten gewonnen werden. Falls membrangebunden, können sie aus der Membran mittels einer geeigneten Detergenzlösung (beispielsweise Triton X-100) oder durch enzymatische Spaltung freigesetzt werden. Zellen, die bei der Expression eines heterologen Fusionsproteins verwendet werden, können durch verschiedene physikalische oder chemische Mittel zerstört werden, wie Gefrier-Auftauzyklen, Ultrabeschallung, mechanische Zerstörung oder Zellysemittel.

**[0052]** Wenn die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung in der geeigneten Wirtszelle exprimiert werden, können die Analoga isoliert und gereinigt werden. Die folgenden Verfahren sind für geeignete Reinigungsverfahren beispielhaft: Fraktionierung auf Carboxymethylcellulose, Gelfiltration, wie Sephadex G-75, Anionenaustauscherharz, wie DEAE oder Mono Q, Kationenaustausch, wie CM oder Mono S, Metallchelatsäulen, um mit Epitop versehene Formen des Polypeptids zu binden, Umkehrphasen HPLC, Chromatofokussierung, Silicagel, Ethanol fällung und Ammoniumsulfat fällung.

**[0053]** Es können verschiedene Verfahren der Proteinreinigung verwendet werden und solche Verfahren sind in der Technik bekannt und beschrieben, beispielsweise in Deutscher, Methods in Enzymology 182, 83–89 (1990) und Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982). Die ausgewählten Reinigungsschritte hängen von der Art des verwendeten Herstellverfahrens und des bestimmten, hergestellten heterologen Fusionsproteins ab. Beispielsweise können heterologe Fusionsproteine, die ein Fc Fragment umfassen, effektiv mittels einer Protein A oder Protein G Affinitätsmatrix gereinigt werden. Es können Puffer mit niedrigem oder hohem pH verwendet werden, um das heterologe Fusionsprotein von der Affinitätsmatrix zu eluieren. Milde Elutionsbedingungen helfen bei der Prävention der irreversiblen Denaturierung des heterologen Fusionsproteins.

**[0054]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können mit einem oder mehreren Hilfsstoffen formuliert werden. Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können mit einem

pharmazeutisch annehmbaren Puffer kombiniert werden und der pH kann unter Bildung einer annehmbaren Stabilität und eines pH eingestellt werden, der zur Verabreichung annehmbar ist, wie zur parenteralen Verabreichung. Optional können ein oder mehrere pharmazeutisch annehmbare antimikrobielle Mittel zugegeben werden. Meta-Cresol und Phenol sind bevorzugte pharmazeutisch annehmbare mikrobiologische Mittel. Es können ein oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Salze zugegeben werden, um die Ionenstärke oder Tonizität einzustellen. Es können ein oder mehrere Hilfsstoffe zugegeben werden, um weiter die Isotonizität der Formulierung einzustellen. Glycerin ist ein Beispiel eines Isotonizitäts-einstellenden Hilfsstoffs. Pharmazeutisch annehmbare Mittel sind zur Verabreichung an einen Menschen oder ein Tier geeignet und enthalten somit keine toxischen Elemente oder unerwünschte Kontaminanten und Wechselwirkungen nicht mit den Wirkstoffe hierin.

**[0055]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können als Lösung oder als lyophilisiertes Pulver formuliert werden, das mit einem geeigneten Verdünnungsmittel rekonstituiert werden kann. Eine lyophilisierte Dosierungsform ist eine, worin das heterologe Fusionsprotein mit oder ohne Pufferkapazität stabil ist, um den pH der Lösung über die beabsichtigte Haltbarkeit des rekonstituierten Produkts aufrechtzuerhalten. Es ist bevorzugt, dass die Lösung, die die hierin vorher diskutierten Fusionsproteine enthält, vor der Lyophilisierung im wesentlichen isotonisch ist, um die Bildung der isotonischen Lösungen nach der Rekonstitution zu ermöglichen.

**[0056]** Eine pharmazeutisch annehmbare Salzform der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung liegt innerhalb des Umfangs der Erfindung. Säuren, die herkömmlich zur Bildung von Säureadditionssalzen verwendet werden, sind anorganische Säuren, wie Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Iodwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und dergleichen und organische Säuren, wie p-Toluolsulfonsäure, Methansulfonsäure, Oxalsäure, p-Bromphenylsulfonsäure, Kohlensäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Benzoesäure, Essigsäure und dergleichen.

**[0057]** Basenadditionssalze umfassen jene, die von anorganischen Basen stammen, wie Ammonium oder Alkali- oder Erdalkalimetallhydroxide, -carbonate, -bicarbonate und dergleichen. Solche Basen, die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Salze brauchbar sind, umfassen Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniumhydroxid, Kaliumcarbonat und dergleichen.

**[0058]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung weisen eine biologische Aktivität auf. Die biologische Aktivität bezieht sich auf die Fähigkeit der heterologen Fusionsproteine zur Bindung und Aktivierung eines Rezeptors in vivo und zur Auslösung einer Reaktion. Eine repräsentative Anzahl an heterologen Fusionsproteinen wird auf ihre in vitro wie auch in vivo Aktivität getestet. Die Beispiele 1 und 2 stellen eine Darstellung der in vitro Aktivität basierend auf der Fähigkeit des heterologen Fusionsproteins zur Interaktion mit und Aktivierung des humanen GLP-1 Rezeptors bereit. In beiden Experimentsätzen werden HEK 293 Zellen verwendet, die den humanen GLP-1 Rezeptor überexprimieren. Die Aktivierung des GLP-1 Rezeptors in diesen Zellen verursacht eine Adenylatcyclaseaktivierung, die wiederum die Expression eines Reportergens induziert, das durch ein cAMP Reaktionselement (CRE) gesteuert wird. Das Beispiel 1 (Tabelle 1) liefert repräsentative Daten, worin das Reportergen beta-Lactamase ist und das Beispiel 2 (Tabelle 2) liefert repräsentative Daten, worin das Reportergen Luciferase ist. Das Beispiel 3 liefert repräsentative Daten, die nach einer Verabreichung der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung an Ratten generiert wurden. Das Beispiel 4 (Tabelle 6) liefert repräsentative Daten, die nach einer Verabreichung der heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung an Affen generiert wurden. Das Beispiel 5 (Tabelle 7) liefert repräsentative Daten der Untersuchung der potenziellen Bildung von Antikörpern nach wiederholten subkutanen Injektionen eines heterologen Fusionsproteins. Das Beispiel 6 (Tabelle 8) liefert repräsentative Daten von einer pharmakodynamischen Studie nach einer Injektion eines heterologen Fusionsproteins an Affen. Das Beispiel 7 (Tabelle 9) liefert repräsentative Daten aus einer pharmakodynamischen Studie nach Injektionen von drei unterschiedlichen Dosen an Ratten. Das Beispiel 8 (Tabelle 10) liefert repräsentative Daten, die nach einer Verabreichung von verschiedenen heterologen Fusionsproteinen der vorliegenden Erfindung an Mäuse generiert wurden. Zusammen zeigen die repräsentativen Daten, dass die heterologen Fusionsproteine zur Bindung und Aktivierung ihrer Rezeptoren fähig sind, aktiver zu sein scheinen als das aktive, therapeutische Peptid, in vivo aktiv sind und eine längere Halbwertszeit aufweisen als das aktive, therapeutische Peptid, nicht immunogen sind und dosisabhängig sind.

**[0059]** Die Verabreichung der heterologen Fusionsproteine kann über jeden bekannten Weg erfolgen, der dem Fachmann als wirksam bekannt ist. Peripher parenteral ist ein solcher Weg. Die parenterale Verabreichung wird in der medizinischen Literatur gewöhnlich als Injektion einer Dosierungsform in den Körper durch eine sterile Nadel oder eine andere mechanische Vorrichtung verstanden, wie eine Infusionspumpe. Periphere,

parenterale Wege können intravenöse, intramuskuläre, subkutane und intraperitoneale Verabreichungswege umfassen.

**[0060]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können auch für eine Verabreichung durch orale, rektale, nasale oder respiratorische Wege zugänglich sein, die keine parenteralen Wege sind. Von diesen nicht-parenteralen Wegen sind der respiratorische Weg und der orale Weg bevorzugt.

**[0061]** Die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können zur Behandlung einer großen Vielzahl an Erkrankungen und Zuständen verwendet werden.

**[0062]** Eine wirksame Menge der hierin beschriebenen heterologen Proteine ist die Menge, die zu einem gewünschten therapeutischen und/oder prophylaktischen Effekt führt, ohne unakzeptable Nebenwirkungen zu verursachen, wenn sie einem Patienten verabreicht werden, der einer Rezeptorstimulation durch das aktive, therapeutische Peptid bedarf. Ein "gewünschter therapeutischer Effekt" umfasst eines oder mehrere der folgenden: 1) Eine Linderung der Symptome, die mit der Erkrankung oder dem Zustand assoziiert sind, 2) eine Verzögerung im Einsetzen der Symptome, die mit der Erkrankung oder dem Zustand assoziiert sind, 3) erhöhte Langlebigkeit im Vergleich mit der Abwesenheit der Behandlung und 4) höhere Lebensqualität im Vergleich zur Abwesenheit der Behandlung.

**[0063]** Es ist bevorzugt, dass die heterologen Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung entweder einmal alle 2 Wochen oder einmal pro Woche verabreicht werden. In Abhängigkeit der zu behandelnden Krankheit kann es erforderlich sein, das heterologe Fusionsprotein öfter als zwei- oder dreimal pro Woche zu verabreichen.

**[0064]** Die vorliegende Erfindung wird nun ausschließlich durch nicht beschränkende Beispiele unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben.

#### Beispiele

##### Beispiel 1 – In vitro GLP-1 Rezeptoraktivierungstest

**[0065]** HEK-293 Zellen, die den humanen GLP-1 Rezeptor unter Verwendung eines CRE-BLAM Systems exprimieren, werden mit 20 000 bis 40 000 Zellen/Vertiefung/100 µl DMEM Medium mit 10% FBS in einer mit Poly-D-Lysin beschichteten schwarzen Platte mit klarem Boden und 96 Vertiefungen angeimpft. Am Tag nach dem Animpfen wird das Medium abgezogen und 80 µl Plasma-freies DMEM Medium wird zugegeben. Am dritten Tag nach dem Animpfen werden 20 µl Plasma-freies DMEM Medium mit 0,5% BSA zugegeben, das unterschiedliche Konzentrationen an verschiedenem heterologem GLP-1-Fc Fusionsprotein enthält und zu jeder Vertiefung gegeben, um eine Dosis-Antwort-Kurve zu erzeugen. Im allgemeinen werden 14 Verdünnungen, die 3 Nanomolar bis 30 Nanomolar an heterologem GLP-1 Fc Fusionsprotein enthalten, verwendet, um eine Dosis-Antwort-Kurve zu erzeugen, aus der die  $EK_{50}$  Werte bestimmt werden können. Nach 5 Stunden Inkubation mit dem Fusionsprotein werden 20 µl  $\beta$ -Lactamasesubstrat (CCF2/AM, PanVera LLC) zugegeben und die Inkubation wird für 1 Stunde fortgesetzt, wonach die Fluoreszenz auf einem Cytofluor bestimmt wird. Der Test wird ferner in Zlokarnik et al. (1998), Science, 278: 84–88 beschrieben. Es werden verschiedene GLP-1 Fc Fusionsproteine getestet und die  $EK_{50}$  Werte sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Werte sind relativ zu Werten, die für Val<sup>8</sup>-GLP-1(7–37)OH bestimmt wurden, das als interne Kontrolle mit jedem Experiment mitgeführt wird.

Tabelle 1

Verbindung	Aktivität	Standardabweichung
Val <sup>8</sup> -GLP-1	100 %	
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	301 %	99
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	314 %	45
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	468 %	120
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Gly <sup>36</sup> -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	441 %	35

## Beispiel 2 – In vitro GLP-1 Rezeptoraktivierungstest

**[0066]** HEK-293 Zellen, die stabil den GLP-1 Rezeptor unter Verwendung eines CRE-Luciferasesystems exprimieren, werden mit 30 000 Zellen/Vertiefung/80 µl DMEM F12 Medium mit geringem Serumgehalt in Platten mit 96 Vertiefungen geimpft. Am Tag nach dem Beimpfen werden 20 µl Aliquots an Testprotein in 0,5% BSA gemischt und mit den Zellen für 5 Stunden inkubiert. Im allgemeinen werden 12 Verdünnungen, die 3 pM bis 3 nM enthalten, mit einer fünffachen Konzentration für jedes Testprotein hergestellt, bevor sie zu den Zellen zugegeben werden, um eine Dosis-Antwort Kurve zu erzeugen, aus der die  $EK_{50}$  Werte bestimmt werden. Nach der Inkubation werden 100 µl Luciferasereagenz direkt zu jeder Platte gegeben und sanft für 2 Minuten gemischt. Die Platten werden in einen Triluxluminnometer gestellt und die Lichtemission, die aus der Luciferaseexpression resultiert, wird berechnet. Es werden verschiedene GLP-1 Fc Fusionsproteine getestet und die  $EK_{50}$  Werte werden in Tabelle 2 dargestellt. Die Werte sind relativ zu  $Va1^8$ -GLP-1(7-37)OH, das als interne Kontrolle in jedem Experiment mitgeführt wird. Da die heterologen Proteine, die im folgenden getestet werden, Dimere sind, sind die Werte so korrigiert, dass ein zweifacher Unterschied in Molarität in Betracht gezogen wird.

Tabelle 2

Verbindung	Aktivität	Standardabweichung
$Va1^8$ -GLP-1	100 %	
$Gly^8$ - $Glu^{22}$ -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	535 %	240
$Gly^8$ - $Glu^{22}$ -GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	595 %	43
$Gly^8$ - $Glu^{22}$ -GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	1119 %	128
$Gly^8$ - $Glu^{22}$ - $Gly^{36}$ -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	398 %	62
$Gly^8$ - $Glu^{22}$ - $Gly^{36}$ -GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A)	417 %	140

## Beispiel 3 – Intravenöser Glucosetoleranztest in Ratten

**[0067]** Das heterologe Fusionsprotein  $Gly^8$ - $Glu^{22}$ - $Gly^{36}$ -GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) wird in einem intravenösen Glucosetoleranztest (IVGTT) bei Ratten evaluiert. Es werden zumindest 4 Ratten in jede der drei Gruppen aufgenommen. Die Gruppe I erhält Träger (Tabelle 3), Die Gruppe II erhält 1,79 mg/kg an  $Gly^8$ - $Glu^{22}$ - $Gly^{36}$ -GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) als einzelne subkutane Injektion (Tabelle 4) und die Gruppe III erhält 0,179 mg/kg an  $Gly^8$ - $Glu^{22}$ - $Gly^{36}$ -GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) als einzelne subkutane Injektion (Tabelle 5). Die Ratten werden subkutan am Morgen von Tag 1 injiziert. 24 Stunden nach der ersten Injektion wird 1 µl Glucose (D50) pro Gramm Körpergewicht als Bolus infundiert. Die Blutproben werden 2, 4, 6, 10, 20 und 30 Minuten nach der Bolusinjektion der Glucose entnommen.

Tabelle 3 – Träger

Insulin AUC (ng + min/ml)	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Durchschnitt	SEM
0-2	11	9,4	7	11	9,6		
2-4	18,1	9,7	5,6	10,6	8,8		
4-6	13,4	7	3,4	9,6	5,9		
6-10	7,9	3,5	2,5	6	2,9		
10-20	3,7	3	2,4	3	2,4		
20-30	2	0	0	0	2,4		
Summe	56,1	32,6	20,9	40,2	32	36,4	5,8

Tabelle 4 – GLP-1-Fc (1,79 mg/kg)

Insulin AUC (ng + min/ml)	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Durchschnitt	SEM
0–2	12,3	17,4	16	14	13		
2–4	21,9	13,3	13,2	13,9	13,6		
4–6	16,8	6,5	9,8	11,1	11,7		
6–10	7,6	3,8	9,2	5,8	7,4		
10–20	3	0	0	3,2	5,6		
20–30	0	0	0	0	0		
Summe	61,6	41	48,2	48	51,3	50	3,4

Tabelle 5 – GLP-1-Fc (0,179 mg/kg)

insulin AUC (ng + min/ml)	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Durchschnitt	SEM
0–2	14,4	29,2	25,4	23,2		
2–4	13,8	26,3	21,2	21,8		
4–6	11,2	19,4	16,4	15,7		
6–10	6,4	10,6	10,5	8		
10–20	3,6	5,8	5,2	5		
20–30	0	0	0	0		
Summe	49,4	91,3	78,7	73,7	78,7	8,7

## Beispiel 4 – Pharmakokinetische Studie nach einer einzelnen, subkutanen Injektion an Javaneraffen

**[0068]** Es wird eine Studie ausgeführt, um die Pharmakokinetik (PK) des heterologen Fusionsproteins Gly<sup>8</sup>-G1u<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7–37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) zu charakterisieren, wenn es als 0,1 mg/kg durch subkutane (sc) Injektion an männlichen Javaneraffen verabreicht wird. Der RIA Antikörper ist für den Mittelteil von GLP spezifisch. Der ELISA verwendet einen N-terminus-spezifischen Fangantikörper und einen Fc spezifischen Detektionsantikörper.

**[0069]** Die resultierenden Plasmakonzentrationen sowohl aus dem ELISA als auch aus dem RIA werden zur Bestimmung der repräsentierten, pharmakokinetischen Parameterwerte verwendet.

**[0070]** Eine Darstellung der resultierenden PK Parameterwerte ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Eine Einzeldosis SC PK aus dem RIA ist mit einer mittleren C<sub>max</sub> von 4467 ng/ml mit einer entsprechenden T<sub>max</sub> von 17,3 Stunden assoziiert. Die mittlere Eliminierungshalbwertszeit beträgt etwa 51,6 Stunden 82,2 Tage).

Tabelle 6

RIA							
Dosis (mg/kg)	Tier Nr.	C <sub>max</sub> <sup>a</sup> (ng/ml)	T <sub>max</sub> <sup>b</sup> (h)	AUC <sub>0-∞</sub> <sup>c</sup> (ng + h/ml)	t <sub>1/2</sub> <sup>c</sup> (h)	CL/F <sup>e</sup> (ml/h/kg)	Vss/F <sup>f</sup> (ml/kg)
0,1	96051	461,0	4,0	37770,5	81,0	2,7	309,2
	96071	430,0	24,0	43150,2	74,2	2,3	248,1
	96091	449,0	24,0	62271,1	82,9	1,6	191,9
RIA	Mittel	446,7	17,3	47730,6	79,3	2,2	249,8
	SD	15,6	11,5	12876,5	4,5	0,5	58,7
ELISA							
	96051	315,4	2,0	9062,3	55,2	11,0	879,4
	96071	289,4	24,0	16653,0	50,3	6,0	436,0
	96091	271,9	24,0	19907,4	49,3	5,0	357,0
ELISA	Mittel	292,2	16,7	15207,6	51,6	7,3	557,5
	SD	21,9	12,7	5565,2	3,2	3,2	281,6

<sup>a</sup> Maximal beobachtete Plasmakonzentration

<sup>b</sup> Zeit der maximal beobachteten Plasmakonzentration

<sup>c</sup> Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit Kurve gemessen von 0 bis Unendlich

<sup>d</sup> Eliminierungshalbwertszeit

<sup>e</sup> Gesamte Körperclearance als Funktion der Bioverfügbarkeit

<sup>f</sup> Verteilungsvolumen als Funktion der Bioverfügbarkeit

SD = Standardabweichung

Beispiel 5 – Untersuchung der potentiellen Bildung von Antikörpern nach wiederholten, subkutanen Injektionen

**[0071]** Designierte Serumproben aus Javaneraffen werden auf die Bildung von Antikörpern gegen Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) unter Verwendung eines direkten ELISA Formats getestet. Mikrotiterplatten werden mit Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml beschichtet. Affenserumproben werden 50, 500, 1000 und 5000 fach in der Blockierungslösung verdünnt und 0,05 ml Probe/Vertiefung werden für etwa 1 Stunde inkubiert. Der sekundäre Antikörper Ziege-human Fab'<sub>2</sub>-Peroxidase (mit 75% Kreuzreaktivität gegenüber dem Menschen) wird 10 000 fach in der Blockierungslösung verdünnt und mit 0,05 ml/Vertiefung zugegeben und für etwa 1 Stunde inkubiert. Die Farbentwicklung unter Verwendung von Tetramethylbenzidinsubstrat (TMB) wird mit einer optischen Dichte von 450 nm bis 630 nm ausgelesen. Es werden doppelte Auswertungen gemittelt. Ein GLP-1 Antikörper wird als Positivkontrolle verwendet und das Ziege-Kaninchen-(H+L)-Peroxidasekonjugat ist der sekundäre Antikörper, der zur Detektion verwendet wird. Serumproben zu bestimmten Zeitpunkten werden vor der Dosierung 24 Stunden nach der zweiten Dosis und 168 Stunden nach der ersten und zweiten SC Dosis zur Evaluierung einer potentiellen Immunogenität entnommen. Das Vorkommen von Antikörpertitern gegen G8E22-CEX-L-hlgG4 wird durch einen Vergleich zu Serumproben vor der Dosierung und einer Positivkontrolle interpretiert. Eine Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7

Dosis1 Tier Nr.	Positiv- kontrol- le	IO7774		IO7777		IO7779		IO7780	
Proben- faktor		Vor Do- sis	168 h						
50x	2,854	0,268	0,268	0,160	0,128	0,144	0,152	0,264	0,224
500x	2,270	0,117	0,133	0,052	0,069	0,065	0,061	0,067	0,061
1000x	1,610	0,091	0,075	0,034	0,051	0,047	0,045	0,138	0,049
5000x	0,525	0,056	0,048	0,032	0,037	0,029	0,033	0,051	0,039
Dosis 2 Tier Nr.	Positiv- kontrol- le	IO7774		IO7777		IO7779		IO7780	
Proben- faktor		Vor Do- sis	24 h						
50x	3,056	0,298	0,231	0,164	0,159	0,227	0,176	0,211	0,192
500x	2,247	0,120	0,119	0,048	0,045	0,061	0,060	0,056	0,057
1000x	1,673	0,090	0,086	0,039	0,041	0,046	0,045	0,043	0,048
5000x	0,534	0,039	0,042	0,030	0,034	0,033	0,036	0,033	0,034
Dosis 2 Tier Nr.	Positiv- kontrol- le	IO7774		IO7777		IO7779		IO7780	
Proben- faktor		Vor Do- sis	168 h						
50x	3,075	0,413	0,270	0,174	0,182	0,185	0,190	0,224	0,191
500x	2,173	0,097	0,103	0,042	0,051	0,056	0,057	0,048	0,053
1000x	1,510	0,066	0,067	0,038	0,040	0,037	0,046	0,043	0,043
5000x	0,474	0,042	0,042	0,033	0,046	0,033	0,033	0,036	0,041

Beispiel 6 – Pharmakodynamische Studie nach einer einzelnen, subkutanen Injektion in Javaneraffen im nüchternen Zustand und während einer abgestuften intravenösen Glucoseinfusion

**[0072]** In Phase 1 (Studientag 1) wird eine subkutane Injektion an Träger verabreicht. Eine abgestufte intravenöse Glucoseinfusion (20% Dextrose) mit 5, 10 und 25 mg/kg/min wird dann unmittelbar nach der Trägerinjektion verabreicht. In Phase 2 (Studientag 3) wird eine subkutane Injektion eines GLP-1 Fusionsproteins (0,1 mg/kg) verabreicht. In Phase 3 wird eine abgestufte, intravenöse Glucoseinfusion für etwa 96 Stunden nach der GLP-1 Fusionsinjektion ausgeführt.

**[0073]** Die abgestuften, intravenösen Glucoseinfusionsverfahren werden in sedierten Affen nach einem Fasten für 16 Stunden über Nacht ausgeführt. Für beide intravenösen Glucoseinfusionen werden alle 10 Minuten für 20 Minuten Grundlinienproben entnommen, um die Grundlinie zu definieren. Eine nach oben gestufte Glucoseinfusion wird bei +20 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 5 mg/kg/min gestartet, wonach Infusionen von 10 mg/kg/min und 25 mg/kg/min erfolgen. Jede Infusionsgeschwindigkeit wird für einen Zeitraum von 20 Minuten verabreicht. Es werden Blutproben in 10 Minuten Intervallen zur Messung der Glucose, des Insulins und des Glucagons entnommen. Etwa 1,0 ml Blut werden -20 Minuten, -10 Minuten und 0 Minuten vor den Glucoseinfusionen und 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten nach der Glucoseinfusion für die Phasen 1 und 3 entnommen.

**[0074]** Eine Darstellung der Daten ist in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8

Glucose AUC					
Gruppe	Tier	AUC (min + mg/dl)	Gruppe	Tier	AUC (min + mg/dl)
GLP-Fc	9423	7447	Träger	9423	8077
	9424	7470		9424	15006
	9510	5153		9510	7116
	9513	6303		9513	7459
	9516	5413		9516	8728
	9530	5240		9530	7863
				N	6
	Mittel	6171		Mittel	9041
	SD	1078		SD	2973
	SE	440		SE	1214
Insulin AUC					
Gruppe	Tier	AUC (min + mg/dl)	Gruppe	Tier	AUC (min + mg/dl)
GLP-Fc	9423	129	Träger	9423	38
	9424	138		9424	29
	9510	357		9510	69
	9513	161		9513	64
	9516	376		9516	38
	9530	215		9530	68
				Mittel	51
	Mittel	229		Mittel	51
	SD	111		SD	18
	SE	45		SE	7

**[0075]** Die Glucagonspiegel sind nicht statistisch unterschiedlich zwischen den mit Träger und dem GLP-1 Fusionsprotein dosierten Affen.

Beispiel 7 – Pharmakodynamische Studie nach einer einzelnen subkutanen Injektion von 3 unterschiedlichen Dosen in Ratten im nüchternen Zustand und während einer abgestuften, intravenösen Glucoseinfusion

**[0076]** Mit Dauerkatheter versehene Ratten werden entweder einer Trägerkontrolle (Kochsalzlösung) oder einer der 3 Behandlungsgruppen zugeordnet (GLP-1 Fusionsprotein, 0,0179 mg/kg, 0,179 mg/kg oder 1,79 mg/kg). Das GLP-1 Fusionsprotein und der Träger werden durch eine subkutane Injektion verabreicht. 24 Stunden nach der Behandlung werden über Nacht (16 h) gefastete Ratten einem abgestuften, intravenösen Glucoseinfusionstest unterzogen. Der abgestufte Glucoseinfusionstest besteht aus einer Grundlinieninfusionsperiode (20 Minuten), gefolgt von zwei 30 minütigen Glucoseinfusionsphasen mit jeweils 5 und 15 mg/kg/min. Die Plasmaproben werden –20 Minuten, –10 Minuten, 0 Minuten vor den Glucoseinfusionen (Grundlinie) und nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten gewonnen.

**[0077]** Eine Darstellung der Daten ist in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9

	5 mg/kg/min	15 mg/kg/min
Träger	4,3 ± 0,2 (n = 18)	12,7 ± 0,9 (n = 18)
0,0179 mg/kg	5,6 ± 0,4 (n = 4)	15,9 ± 1,8 (n = 4)
0,179 mg/kg	9,0 ± 1,1* (n = 6)	28,0 ± 3,8* (n = 6)
1,79 mg/kg	20,5 ± 3,0* (n = 4)	52,7 ± 7,2* (n = 4)

\*  $P \leq 0,05$  gegenüber Träger

#### Beispiel 8 – Pharmakokinetische Analyse des FGF-21 Fusionsproteins

**[0078]** FGF-21 Fusionsproteine werden durch intravenöse (i. v.) oder subkutane (s. c.) Wege mit einer Dosis von 0,4 mg/kg an CD-1 Mäuse verabreicht. Die Tiere lässt man zu verschiedenen Zeiten zwischen 0 und 336 Stunden nach der Dosierung bluten. Das Plasma wird aus jeder Probe gewonnen und durch einen Radioimmunttest analysiert. Es werden pharmakokinetische Parameter unter modellabhängigen (i. v. Daten) und unabhängigen (s. c. Daten) Methoden (WinNonlin Pro) berechnet und sind in der folgenden Tabelle 10 angegeben. Durch eine i. v. Verabreichung hat das FGF-21-Fc Fusionsprotein eine Eliminierungshalbwertszeit von etwa 53,9 Stunden im Vergleich zu einer Eliminierungshalbwertszeit von 0,5 Stunden für natives FGF-21. Durch eine s. c. Verabreichung hat das FGF-21-Fc Fusionsprotein eine Eliminierungshalbwertszeit von etwa 24 Stunden im Vergleich zu einer Eliminierungshalbwertszeit von 0,6 Stunden für natives FGF-21. Über beide Verabreichungswege zeigt das FGF-21 Fusionsprotein eine verlängerte Wirkdauer, wenn es mit nativem FGF-21 verglichen wird.

Tabelle 10

Verbindung	Weg	$C_{max}^a$ (ng/ml)	$T_{max}^b$ (d)	$AUC_{0-\infty}^c$ (ng + h/ml)	$t_{1/2}^d$ (h)	CL/F <sup>e</sup> (ml/h/kg)	% F <sup>f</sup>
FGF-21-Fc	i. v.	4432	-	137383	53,9	2,9	
	s. c.	1899	24	145056	48,6	2,8	106
FGF-21	i. v.	4300	-	1200	0,5	803	-
	s. c.	440	1,0	980	0,6	1024	78

<sup>a</sup> Maximal beobachtete Plasmakonzentration

<sup>b</sup> Zeit der maximal beobachteten Plasmakonzentration

<sup>c</sup> Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit Kurve gemessen von 0 bis Unendlich

<sup>d</sup> Eliminierungshalbwertszeit

<sup>e</sup> Gesamte Körperclearance als Funktion der Bioverfügbarkeit

<sup>f</sup> Prozentuale Bioverfügbarkeit

## Sequenzliste

<110> Eli Lilly and Company

<120> Fusionsproteine

<130> X-16821

<150> 60/477880

<151> 12.6.2003

<150> 60/570908

<151> 13.5.2004

<160> 8

<170> PatentIn Version 3.3

<210> 1

<211> 230

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Synthetisches Konstrukt

<220>

<221> Sonstiges Merkmal

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

<223> Xaa an der Position 1 steht für Ala oder fehlt,

<220>

<221> Sonstiges Merkmal

<222> (16)...(16)

<223> Xaa an der Position 16 steht für Pro oder Glu,

<220>

<221> Sonstiges Merkmal

<222> (17)..(17)

<223> Xaa an der Position 17 steht für Phe, Val oder Ala,

<220>

<221> Sonstiges Merkmal

<222> (18)..(18)

<223> Xaa an der Position 18 steht für Leu, Glu oder Ala,

<220>

<221> Sonstiges Merkmal

<222> (80)...(80)

<223> Xaa an der Position 80 steht für Asn oder Ala,

<220>

<221> Sonstiges Merkmal

<222> (230)...(230)

<223> Xaa an der Position 230 steht für Lys oder fehlt

<400> 1

Xaa Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

20

25

30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 35 40 45

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa  
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 85 90 95

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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 115 120 125

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 165 170 175

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
 225 230

<210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Künstlich

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt  
<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 3  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
Pro Pro Cys Pro Ser Cys  
1 5

<210> 4  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Künstlich  
<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt  
<400> 4

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 5  
<211> 825  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5

cacggcgagg gcaccttcac ctccgacgtg tcctcctatc tcgaggagca ggccgccaag	60
gaattcatcg cctggctggt gaaggcgccg ggcggtggtg gtggctccgg aggcggcgcc	120
tctggtggcg gtggcagcgc tgagtccaaa tatggtcccc catgcccacc ctgcccagca	180
cctgaggccg ccgggggacc atcagttctc ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc	240
atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc	300
gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg	360
cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag	420
gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc	480
atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg	540
ccccatccc aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	600
ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gaaagcaatg ggcagccgga gaacaactac	660
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc	720
gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget	780
ctgcacaacc actacacaça gaagagcctc tcctgtctc tgggt	825

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	20 25 30

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 7

Asp Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Asp Ala Ala Ala Arg Glu	1 5 10 15
Ala Ala Ala Arg Asp Ala Ala Ala Lys	20 25

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 8

Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg
1				5					10				

### Patentansprüche

1. Heterologes Fusionsprotein, umfassend ein aktives therapeutisches Peptid, das an den Fc Teil eines Immunglobulins fusioniert ist, wobei der Fc Teil die folgende Sequenz SEQ ID NO: 1 umfasst

Xaa<sub>1</sub>-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-  
Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-  
Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-  
Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-  
Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-  
Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-  
Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-  
Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-  
Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-  
Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-  
Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-  
Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-  
Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-  
Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-  
Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-  
Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa<sub>230</sub>-(SEQ ID NO:1)

worin

Xaa an der Position 1 für Ala steht oder fehlt,

Xaa an der Position 16 für Pro oder Glu steht,

Xaa an der Position 17 für Val oder Ala steht,

Xaa an der Position 18 für Ala steht,

Xaa an der Position 80 für Asn oder Ala steht, und

Xaa an der Position 230 für Lys steht oder fehlt.

2. Heterologes Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die C-terminale Aminosäure des aktiven therapeutischen Peptids an den N-terminalen Rest des Fc Teils über einen Peptidlinker fusioniert ist, der eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus:

a) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2);

b) Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4);

c)

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 6);

d) Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Asp-Ala-Ala-Ala-Arg-Glu-Ala-Ala-Ala-Arg-Asp-Ala-Ala-Ala-Lys (SEQ ID NO: 7); und

e) Asn-Val-Asp-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg (SEQ ID NO: 8).

3. Polynucleotid, das für das heterologe Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 kodiert.
4. Vektor, umfassend das Polynucleotid nach Anspruch 3.
5. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 4.
6. Wirtszelle, zur Expression des heterologen Fusionsproteins nach Anspruch 1 oder 2.
7. Wirtszelle nach Anspruch 6, worin diese Zelle eine CHO Zelle ist.
8. Wirtszelle nach Anspruch 6, worin diese Zelle eine NSO Zelle ist.
9. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Fusionsproteins, umfassend die Stufen einer Transkription und Translation eines Polynucleotids nach Anspruch 3 unter solchen Bedingungen, dass das heterologe Fusionsprotein in detektierbaren Mengen exprimiert wird.
10. Heterologes Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 zur Verwendung als ein Arzneimittel.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen