

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 049**

51 Int. Cl.:

C07K 14/495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2019 PCT/US2019/024756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2019 WO19195091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2019 E 19725879 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022 EP 3774860**

54 Título: **Compuestos agonistas del factor 15 de diferenciación del crecimiento y procedimientos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

06.04.2018 US 201862653759 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.03.2023

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**GONCIARZ, MALGORZATA DONATA;
OBUNGU, VICTOR H. y
PICKARD, RICHARD TODD**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 937 049 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos agonistas del factor 15 de diferenciación del crecimiento y procedimientos de utilización de los mismos

La divulgación se refiere a la biología y la medicina, y más particularmente, se refiere a compuestos y composiciones que incluyen un compuesto agonista del factor 15 de diferenciación de crecimiento (GDF15) que tiene un tiempo de acción prolongado y otras propiedades ventajosas, así como con usos terapéuticos para inducir la pérdida de peso y para tratar la diabetes, la dislipidemia, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y/o la obesidad.

GDF15 (también conocido como MIC-1, NAG-1) es una proteína de nudo de cisteína (Cys, C) perteneciente a la superfamilia del factor beta de crecimiento transformante (TGF β). Su concentración circulante se ha implicado en diversas funciones biológicas, como la caquexia y el metabolismo del cáncer (véase Emmerson et al. (2017) Nat. Med. 23:1215-1219). El GDF15 humano maduro (SEQ ID NO:1) es un péptido de 112 aminoácidos. El GDF15 circulante forma un homodímero de la proteína madura (25 kDa) a través de lo que se informa que es un enlace disulfuro entre cadenas entre el residuo Cys en la posición 77 de SEQ ID NO:1 en cada cadena del homodímero (que corresponde a la posición 316 en SEQ ID NO:2). Se cree que la formación de homodímero es necesaria para la actividad biológica de GDF15 (véase, la Publicación de Solicitud de Patente Intl. No WO 2017/147742).

Entre las muchas funciones biológicas reportadas de un homodímero maduro de GDF15, la regulación de la homeostasis energética ha ganado atención debido a su potencial para tratar la obesidad y la diabetes tipo 2 (T2D). La conexión entre la actividad del homodímero GDF15 maduro y la homeostasis energética se basa en la observación de que el aumento de los niveles séricos de GDF15 maduro se correlaciona con la pérdida de peso en individuos con cáncer de próstata avanzado (Emmerson et al. (2017)).

Además, el aumento de GDF15 en ratones mediante la administración de GDF15 recombinante o a través de su expresión y secreción a partir de xenoinjertos tumorales ilustró que GDF15 induce la pérdida de peso a través de su capacidad para disminuir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético. Además, los ratones transgénicos que sobreexpresaban GDF15 eran resistentes a la obesidad inducida por la dieta y presentaban una mejor tolerancia a la glucosa, mientras que los ratones GDF15 bloqueados genéticamente tenían un mayor peso corporal y masa grasa. Además, se demostró que la pérdida de peso inducida por GDF15 reduce las respuestas inflamatorias y aumenta la esperanza de vida de los roedores.

El receptor similar a alfa (GFRAL) del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) ha sido identificado como el receptor de unión a ligando para GDF15. La pérdida del efecto anoréctico del GDF15 en ratones deficientes en GFRAL, así como en ratas a las que se administró un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-GFRAL, ilustró que el GFRAL es el principal responsable de los efectos metabólicos del GDF15 (Emmerson et al. (2017)).

La semivida natural ($t_{1/2}$) del agonista homodímero GDF15 humano maduro circulante es relativamente corta (aproximadamente 2-3 horas). Sin embargo, la publicación de solicitud de patente Intl. No WO 2015/017710 describe en general la ampliación de la $t_{1/2}$ de los agonistas de GDF15 mediante diversas conjugaciones, incluida la conjugación con una región cristalizable de fragmento (Fc).

Existe la necesidad de compuestos GDF15 biológicamente activos con un tiempo de acción prolongado que puedan utilizarse en terapias para inducir la pérdida de peso y para tratar la T2D, la dislipidemia, la EHNA y/o la obesidad. Un compuesto terapéuticamente deseable agonizaría el receptor GFRAL y proporcionaría propiedades ventajosas. Una propiedad ventajosa sería inducir la pérdida de peso. Otra propiedad ventajosa sería la estabilidad *in vivo* durante un periodo de tiempo prolongado en el intervalo terapéutico, para permitir un nivel constante del compuesto en el torrente sanguíneo con una dosificación semanal para lograr el efecto terapéutico deseado. Otras propiedades deseables son la disminución de la inmunogenicidad. Además, un compuesto deseable tendría propiedades ventajosas de estabilidad física y/o química.

En vista de lo anterior, la divulgación describe compuestos análogos de GDF15 biológicamente activos que tienen una $t_{1/2}$ extendida y otras propiedades deseables. Más concretamente, los compuestos del presente documento son proteínas de fusión recombinantes que tienen un Fc IgG4 humano monomérico sin bisagra (una unidad Fc por GDF15) unido mediante un enlazador rígido al extremo amino (N) de un compuesto análogo de GDF15, por lo que los compuestos forman un homodímero unido covalentemente mediante al menos un enlace disulfuro entre cadenas, entre las porciones GDF15 de cada uno de los monómeros. Un compuesto ejemplar, el Compuesto 2, es un homodímero de dos moléculas del Compuesto 1 (SEQ ID NO:2) y sorprendentemente ha mostrado un $t_{1/2}$ mejorado de hasta aproximadamente 117 horas, lo que puede proporcionar una eficacia prolongada y puede permitir una dosificación semanal del compuesto. Los compuestos presentes en este documento también tienen una estabilidad física mejorada. Por ejemplo, el Compuesto 2 tiene un bajo 4,1 % de agregado soluble de Alto Peso Molecular (HMW) en el conjunto de captura de Proteína A. El compuesto 2 también exhibe una estabilidad química mejorada, como un bajo crecimiento porcentual del 0,75 % de Bajo Peso Molecular (LMW) a 1 mg/ml, tras 4 semanas de almacenamiento a 40 °C en citrato a pH 6,0.

En una realización, se proporciona un compuesto que comprende SEQ ID NO:2.

En otra realización, se proporciona un compuesto que incluye un homodímero que comprende dos monómeros, cada uno de los cuales incluye SEQ ID NO:2, en donde los dos monómeros están unidos mediante al menos un enlace disulfuro entre cadenas entre un residuo de Cys del primer monómero y un residuo de Cys del segundo monómero.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto con SEQ ID NO:2 o un homodímero de dos monómeros de SEQ ID NO:2 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, se proporciona un compuesto que tiene SEQ ID NO:2 o un homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2 para su uso en terapia. Alternativamente, se proporciona un compuesto que tiene SEQ ID NO:2 o un homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2 para su uso en la inducción de la pérdida de peso o para su uso en el tratamiento de T2D, dislipidemia, EHNA y/u obesidad.

En el presente documento se divulga un compuesto que se produce cultivando una célula de mamífero que incluye una molécula de ADNc que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en condiciones tales que el polipéptido se expresa, y recuperando el compuesto. Además, se proporciona un compuesto del presente documento o una composición del presente documento para inducir la pérdida de peso en un individuo o para el tratamiento de T2D, dislipidemia, EHNA y/u obesidad, en donde el compuesto o la composición se administran una vez por semana.

Tal como se utiliza en el presente documento, "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor o valores tales como, por ejemplo, una concentración, longitud, peso molecular, pH, identidad de secuencia, marco temporal, temperatura, volumen, *etc.* indicados. Dicho valor o intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud típicamente dentro del 20 %, más típicamente dentro del 10 %, y aún más típicamente dentro del 5 % de un valor o intervalo dados. La variación admisible englobada por "aproximadamente" dependerá del sistema particular que se esté estudiando, y puede ser apreciada fácilmente por un experto en la técnica.

Como se usa en el presente documento, por "cantidad efectiva" se entiende una cantidad o dosis de un compuesto, en este documento o una composición farmacéutica que contiene un compuesto que por la administración de una o varias dosis al paciente o sujeto provocará la respuesta biológica o médica o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o ser humano que busca el investigador, veterinario, médico u otro clínico. preferentemente, una cantidad eficaz de un compuesto o composiciones que contengan un compuesto de la presente invención, a un paciente que lo necesite daría lugar a una pérdida neta de peso corporal. Una dosis puede incluir una dosis de carga inicial más alta, seguida de una dosis más baja.

Tal como se utiliza en el presente documento, "individuo", "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente y significan un animal, especialmente un ser humano. Cuando se trata de un ser humano, el individuo se caracteriza por padecer una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la administración de un compuesto o composición del presente documento.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" significa manejar y cuidar a un individuo que tiene una condición para la cual está indicada la administración de GDF15 con el propósito de combatir o aliviar los síntomas y complicaciones de esas condiciones. El tratamiento incluye la administración de un compuesto o composición que incluya un compuesto del presente documento a un individuo que lo necesite, para prevenir la aparición de síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad, afección o trastorno. En particular, el tratamiento incluye la administración de un compuesto o composición que incluya un compuesto del presente documento a un individuo que lo necesite, para producir una pérdida neta de peso corporal. El individuo tratado puede ser un animal, especialmente un ser humano.

Las composiciones farmacéuticas del presente documento pueden administrarse por vía parenteral a un individuo que necesite dicho tratamiento. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo bolígrafo, o un inyector accionado mecánicamente. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse mediante una bomba de infusión. Además, las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante una variedad de técnicas que utilizan excipientes convencionales para productos farmacéuticos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª edición, University of the Sciences in Philadelphia, Filadelfia, PA, EE.UU. (2006)).

Los compuestos y composiciones del presente documento pueden utilizarse en combinación simultánea, separada o secuencial con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para inducir la pérdida de peso y para tratar la diabetes, las afecciones relacionadas con la T2D, la dislipidemia EHNA y/o la obesidad. Ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos adicionales que pueden combinarse con los compuestos reivindicados incluyen, pero no se limitan a, insulina o análogos de la insulina; biguanidas; sulfonilureas; tiazolidinonas; inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 ("DPP-4"); inhibidores del transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT2); compuestos de

incretina como el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) o análogos del GLP-1, el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) o análogos del GIP, la oxintomodulina (OXM) o análogos del OXM; o combinaciones de cualquiera de los agentes anteriores. Los compuestos del presente documento y el agente o agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse conjuntamente a través de la misma vía y dispositivo de administración, como una única píldora, cápsula, comprimido o formulación inyectable; o administrarse por separado, ya sea al mismo tiempo en dispositivos o vías de administración independientes; o administrarse secuencialmente.

Los compuestos del presente documento pueden prepararse mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los compuestos pueden prepararse mediante la producción de una proteína o molécula proteica precursora utilizando técnicas de ADN recombinante. El ADN, incluidos el ADNc y el ADN sintético, puede ser bicatenario o monocatenario. Las secuencias codificantes que codifican los compuestos pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético. El ADN puede introducirse en una célula huésped para producir el compuesto o su precursor. Las células huésped pueden ser células bacterianas, como las cepas K12 o B de *Escherichia coli*, células fúngicas, como las células de levadura, o células de mamífero, como las células de ovario de hámster chino ("CHO").

Una célula huésped apropiada se transfecta o transforma de forma transitoria o estable con un sistema de expresión, como vectores de expresión, para producir un compuesto o un precursor del mismo. Los vectores de expresión suelen ser replicables en los organismos huéspedes, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, glutamin sintetasa y dihidrofolato reductasa, para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

Los compuestos del presente documento pueden prepararse mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica, así como por los métodos descritos a continuación. Los pasos biosintéticos o sintéticos específicos para cada uno de los pasos descritos pueden utilizarse, no utilizarse o combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos del presente documento.

Los compuestos análogos de GDF15 del presente documento pueden actuar como compuestos GFRAL y se producen en un sistema de expresión de células de mamífero utilizando derivados de células CHOK1. Los genes que codifican las proteínas GDF15 se subclonan en esqueletos de plásmido de expresión que contienen glutamina sintetasa (GS) (plásmidos basados en pEE12.4). La secuencia de ADNc (SEQ ID NO:16) que codifica el Compuesto 1 (SEQ ID NO:2), una proteína Fc-GDF15 ejemplar, se fusiona en el marco con la secuencia de codificación de una secuencia de péptido señal, METDTLLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID NO:3) para potenciar la secreción del producto deseado en el medio de cultivo tisular.

La expresión está dirigida por el promotor viral del citomegalovirus (CMV). Las células CHOK1 SV se transfectan de forma estable mediante electroevaporación y la cantidad adecuada de plásmido de expresión recombinante, y las células transfectadas se mantienen en cultivo en suspensión a una densidad celular adecuada. La selección de las células transfectadas se lleva a cabo mediante el crecimiento en un medio libre de suero que contenga 25 µM de metionina sulfoximina (MSX) y se incuba a aproximadamente 35 °C-37 °C y a un 5-7 % de CO₂. Las proteínas GDF15 o las proteínas de fusión Fc-GDF15 se secretan en el medio a partir de las células CHO. Las porciones GDF15 de las proteínas se asocian entre sí, creando homodímeros que comprenden dos proteínas GDF15 u homodímeros de proteínas de fusión Fc-GDF15 conectadas entre sí mediante un enlace disulfuro entre cadenas. Los homodímeros GDF15 o Fc-GDF15 pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad con proteína A, seguida de cromatografía de intercambio aniónico e hidrófoba.

Los homodímeros de la proteína GDF15 de los medios recolectados se capturan en una resina Capto Blue (GE). Los homodímeros de proteína Fc-GDF15 de los medios recolectados se capturan en resina Mab Select Protein A (GE). A continuación, la resina se lava brevemente con un amortiguador de migración, como una solución salina amortiguada con fosfato (PBS; pH 7,4) o un amortiguador de migración que contenga Tris, para eliminar el material unido de forma no específica. La proteína se eluye de la resina con una solución de pH bajo, como ácido cítrico 10 mM con pH 3. Las fracciones que contienen proteínas GDF15 se agrupan y pueden mantenerse a un pH bajo para inactivar potenciales virus. El pH puede neutralizarse añadiendo una base como 0,1 M Tris con pH 8,0. La proteína GDF15 puede purificarse aún más mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando resinas como Poros XQ (Life Technologies). La proteína GDF15 se eluye de la columna AEX utilizando un gradiente de 0 a 200 mM de NaCl en 50 mM de Tris, pH 8,0 a lo largo de 15 volúmenes de columna.

La proteína de fusión Fc-GDF15 puede purificarse aún más mediante cromatografía de interacción hidrófoba utilizando una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). La columna se realiza ajustando la solución de carga a alrededor de 0,5 M de sulfato sódico y se eluye utilizando un gradiente de 10 volúmenes de columna (CV) que va de 0,5 M a 0 M de sulfato sódico en una solución de 20 mM de Tris con pH 8. Tras el HIC, la proteína puede purificarse aún más mediante cromatografía de exclusión por tamaño cargando el conjunto concentrado de Capto Phenyl ImpRes en un Superdex200 (GE Healthcare) con elución isocrática en PBS con pH 7,4.

Los compuestos GDF15 purificados pueden pasarse a través de un filtro de retención viral como Planova 20N (Asahi Kasei Medical) seguido de concentración/diafiltración en citrato 10 mM, NaCl 150 mM con pH 7 utilizando ultrafiltración de flujo tangencial en una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

5 El dominio extracelular (ECD) soluble de GFRAL humano se produce en un sistema de expresión de células de mamífero utilizando derivados de células CHOK1. El ECD GFRAL marcado con polihistidina procedente de medios recolectados se captura en cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados sobre níquel (IMAC). A continuación, la resina se lava brevemente con un amortiguador de migración, como PBS con pH 7,4, o un amortiguador de migración que contenga Tris (pH 8,0, 500 mM en NaCl) para eliminar el material unido de forma no específica. El ECD GFRAL marcado con HIS unido (SEQ ID NO:4) se eluye utilizando 0-250 mM de imidazol en PBS o TRIS (pH 8,0, 500 mM de NaCl) en 10 volúmenes de columna. El ECD GFRAL marcado con HIS puede purificarse aún más mediante cromatografía de exclusión por tamaño cargando el conjunto IMAC concentrado en una Superdex200 (GE Healthcare) con elución isocrática en PBS (pH 7,4).

15 La expresión de anticuerpos en mamíferos produce glicosilación. Normalmente, la glicosilación se produce en la región Fc del anticuerpo en un sitio de glicosilación en N altamente conservado. Los N-glicanos se unen típicamente a la asparagina. En una región constante típica de las inmunoglobulinas IgG, sólo hay un sitio para la glicosilación ligada a N. Sin embargo, este sitio puede modificarse para evitar la glicosilación o pueden añadirse sitios adicionales para estructuras de glicosilación adicionales o diversas. Además, la glicosilación ocurre ocasionalmente en otras regiones de moléculas expresadas en células de mamíferos.

Los compuestos del presente documento se preparan de esta manera o de una manera similar que sería fácilmente determinada por un experto en la técnica.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos no limitantes se ofrecen con fines ilustrativos, no limitantes.

Ejemplo 1: Afinidad del receptor *in vitro*

Los parámetros de unión *in vitro* del homodímero GDF15 humano y del Compuesto 2 ejemplar a un receptor GFRAL humano se determinan mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). El ECD GFRAL incluye tres dominios ricos en Cys (D1, D2 y D3). La afinidad de un homodímero de GDF15 humano (des-ARN SEQ ID NO:1; es decir, GDF15 que carece de Ala, Arg y Asp en el extremo N-terminal) y el Compuesto 2, un homodímero del Compuesto Fc-GDF15 1 (SEQ ID NO:2) a ECD GFRAL humano marcado con HIS (SEQ ID NO:4) puede medirse mediante SPR. La cinética se resume en la Tabla 1.

35 Para medir la unión de GDF15 humano (des-ARN SEQ ID NO:1) o del Compuesto 2 al ECD GFRAL humano, se utiliza un instrumento Biacore T200 para medir la cinética de unión del homodímero GDF15 humano (des-ARN SEQ ID NO:1) y del Compuesto 2 al ECD GFRAL. Las mediciones se realizan a 25 °C. Las muestras se disuelven en HBS-EP+, pH 7,4 (GE Healthcare; 10 mM de HEPES pH 7,4 + 150 mM de NaCl + 3 mM de EDTA + 0,05 %de surfactante P20). El anticuerpo GDF15 de cabra anti-conejo (R&D) se inmoviliza en las celdas de flujo de un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de aminas. Se preparan muestras de GDF15 a 25 µg/ml por dilución en amortiguador de migración.

45 Se preparan muestras de ECD GFRAL humano a concentraciones finales de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0 y 0 (blanco) nM por dilución en amortiguador de migración. El experimento SPR incluye los siguientes pasos: (1) captura de muestras de GDF15 en celdas de flujo separadas (Fc2, Fc3 y Fc4), (2) inyección de 200 µl de ECD GFRAL humana en todas las celdas de flujo a 100 µl/min, (3) disociación durante 600 segundos, (4) regeneración de las superficies de los chips con una inyección de 10 µl (30 segundos) de glicina, pH 1,5, a 20 µl/min, y (5) equilibrio de las superficies de los chips con una inyección de 10 µl (30 segundos) de HBS-EP+ a 20 µl/min. Cada concentración de ECD GFRAL humano se inyecta por duplicado.

50 Los datos se procesan utilizando doble referencia estándar y se ajustan a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de evaluación T200 de Biacore, para determinar la velocidad de asociación (k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$), la velocidad de disociación (k_{off} , s^{-1}) y $R_{m\acute{a}x}$ (unidades de respuesta (UR)). La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcula a partir de la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$, (M).

55

Tabla 1: Cinética de unión del homodímero GDF15 humano y del homodímero del compuesto 2 al receptor ECD GFRAL humano (D1-D2-D3-ECD) a 25 °C.

Compuesto	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (nM)
GDF15 humano (homodímero de dos compuestos que incluye des-ARN SEQ ID NO:1)	2,92E+05	7,21E-03	7,2
Compuesto 2 (homodímero de dos compuestos que incluyen SEQ ID NO:2)	1,05E+06	8,71E-03	8,3

- 5 Los resultados muestran que el homodímero GDF15 humano (dos compuestos que comprenden des-ARN SEQ ID NO:1) tenía una afinidad de 7,2 nM por el ECD GFRAL humano, y el homodímero Compuesto 2 (dos compuestos que comprenden SEQ ID NO:2) tenía una afinidad de 8,3 nM por el ECD GFRAL humano.

Ejemplo 2: Actividad funcional *in vitro*

10 GFRAL, el receptor para GDF15, es un miembro de la familia de receptores GDNF y contiene un único dominio transmembrana y ningún dominio de señalización intracelular. Los miembros de la familia de receptores del GDNF, incluido el GFRAL, utilizan el correceptor RET para transducir una señal. Se sabe que la estimulación del complejo receptor/RET del GDNF activa redes de transducción de señales que implican la fosforilación de ERK, AKT y STAT.

15 Para evaluar la actividad y la potencia relativa de las variantes humanas maduras de GDF15, se transfectan células HEK293 (ATCC) con vectores de expresión de mamíferos impulsados por CMV que contienen GFRAL humano (NCBI Ref. Secuencia N° NP_997293.2) y RET51 humana (NCBI Ref. Secuencia N° NP_066124.1) y se cultivan durante tres semanas en presencia de geneticina y puromicina (Life Technologies) para crear un conjunto de células que expresen de forma estable ambas proteínas. La medición de la fosforilación de ERK1/2 se elige como punto final para evaluar la activación de RET utilizando un kit de ensayo AlphaLISA Surefire Ultra Phospho-ERK1/2 (Perkin Elmer), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y un lector de microplacas EnVision Multilabel modelo 2102 (Perkin Elmer).

20 Brevemente, las células HEK293-hGFRAL/hRET, entre el pasaje 10-20, se siembran a 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas de poli-D-lisina y se cultivan durante tres días a 37 °C en una atmósfera de 5 CO₂/95% O₂. Las células se incuban en medio libre de suero durante 4 h y después se tratan, según se indica, durante 10 min, se lisan y se congelan hasta su análisis. Los lisados celulares se descongelan incubándolos durante 1 h a 4 °C, se mezclan en un agitador orbital de placas y se transfieren a una placa blanca de 384 pocillos. El método AlphaLISA de "2 placas/1 incubación" se utiliza añadiendo las Mezclas Aceptora y Donante, suministradas con el kit de ensayo, a los lisados e incubando a temperatura ambiente en la oscuridad durante 8 horas antes de la medición de la señal AlphaLISA en el Lector de Placas EnVision.

30 Cada placa de células utilizada para un ensayo incluye GDF15 maduro humano nativo como estándar de referencia para el rendimiento del ensayo. Los datos de fosforilación de ERK1/2 (pERK1/2) de múltiples placas se recogen en un único gráfico convirtiendo los datos brutos de la señal AlphaLISA en el eje Y a %Máximo, relativo al estándar de referencia GDF15 humano utilizando la siguiente fórmula:

$$35 \quad \%Máxima = 100 * (x - \min) / (\max - \min),$$

donde min = 0 y representa la ausencia de estimulación, max = 100 y representa la estimulación observada a una dosis saturante de compuesto, y x = cualquier tratamiento dado. La EC₅₀ para cada compuesto se determina utilizando una curva dosis-respuesta sigmoidal de pendiente variable con regresión logística de cuatro parámetros en GraphPad Prism versión 7.00. La EC₅₀ indicada para cada compuesto en la Tabla 2 se determina generando la media geométrica de la EC₅₀ para 3 ensayos independientes de cada compuesto utilizando la siguiente fórmula

$$40 \quad \text{Media geom.} = \sqrt[3]{X1 * X2 * X3}.$$

45 Para evaluar la potencia del compuesto 2 se utilizan células HEK293 que expresan tanto GFRAL humano como RET51 humano. El GDF15 humano nativo maduro (SEQ ID NO:1), como homodímero, se utiliza como patrón de referencia en cada placa de células. Los artículos de prueba se ejecutan por cuadruplicado en tres experimentos independientes.

Tabla 2: Comparación de la potencia del compuesto 2 con el GDF15 humano.

Artículo de prueba	EC ₅₀ (pM)	SEM	N
GDF 15 humano maduro (homodímero de dos compuestos que incluyen SEQ ID NO:1)	27,9	2,9	3
Compuesto 2 (homodímero de dos compuestos que incluyen SEQ ID NO:2)	86,2	5,8	3
Los datos de un experimento representativo se muestran como media ± SE N, número de experimentos independientes			

Ejemplo 3: Eficacia *in vivo* en modelos de rata normales

- 5 La obesidad es una comorbilidad común asociada con la diabetes y la resistencia a la insulina. Se ha informado de que el GDF15 suprime la ingesta de alimentos, induce la pérdida de peso y mejora la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, un compuesto GDF15 puede ser eficaz en la terapia para inducir la pérdida de peso y para afecciones como T2D, dislipidemia, EHNA y/u obesidad. El compuesto 2 se administra en ratas macho Sprague Dawley durante un periodo de 15 días con mediciones diarias del peso corporal y la ingesta de alimentos.
- 10 Las ratas Sprague-Dawley macho normales (Envigo; 14 semanas de edad) se mantienen con una dieta de comida normal a su llegada a las instalaciones (TD2014; Teklad, Madison, WI) y se utilizan en los siguientes estudios. Los animales se alojan individualmente en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 06:00) y libre acceso a comida (TD2014) y agua.
- 15 Después de un mínimo de una semana de aclimatación a la instalación, las ratas son aleatorizadas de acuerdo con su peso corporal, de modo que cada grupo experimental de animales tendría un peso corporal similar. El peso corporal oscilaba entre 332 y 369 gramos.
- 20 Todos los grupos contienen cinco ratas. El vehículo o el Compuesto 2 (intervalo de dosis de 0,01 a 0,3 mg/kg) disuelto en vehículo (PBS) se administran mediante inyección subcutánea (SC) (1 ml/kg) a ratas normales alimentadas *ad libitum* cada 3 días durante 15 días.
- 25 Las inyecciones subcutáneas se realizan los días 1, 4, 7, 10 y 13. Se realizan mediciones diarias del peso corporal y de la ingesta de alimentos durante todo el periodo de estudio. El porcentaje de peso corporal se calcula diariamente a partir del peso corporal inicial de cada animal de la siguiente manera

$$\% \text{ de peso corporal} = (\text{peso corporal diario} / \text{peso corporal inicial}) \times 100.$$

- 30 Todos los datos se presentan como la media ± SEM de cinco animales por grupo. Las concentraciones de dosis efectivas para la pérdida porcentual de peso y la ingesta acumulativa de alimentos se determinan en GraphPad Prism utilizando la herramienta de ajuste no lineal. El análisis estadístico se realiza mediante Mediciones repetidas de ANOVA, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples. Se identifican diferencias significativas en *-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001, ****-p<0,0001.

Tabla 3: Efecto del Tratamiento con el Compuesto 2 sobre el Porcentaje de Peso Corporal y la Ingesta Acumulada de Alimentos en Ratas SD Normales.

Tratamiento	Peso corporal (%)	Ingesta acumulada de alimentos (g)
Vehículo (1 ml/kg, SC)	106,69±0,54	264,48±7,28
Compuesto 2 (0,01 mg/kg)	93,34±2,13.*	193,04±8,54.*
Compuesto 2 (0,03 mg/kg)	85,18±2,60.*	155,42±11,13. *
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	81,80±1,66.*	122,54±14,05. *
Compuesto 2 (0,1 mg/kg)	78,30±3,71.*	115,74±15,75. *
Compuesto 2 (0,3 mg/kg)	73,57±1,56.*	91,22±8,57. *
Todos los datos se presentan como la media ± SEM de 5 animales por grupo del día 14. El análisis estadístico se realizó mediante Mediciones repetidas de ANOVA, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples. Se identificaron diferencias significativas en *p<0,05.		

El tratamiento crónico con el Compuesto 2 en ratas macho SD normales produjo una reducción estadísticamente significativa de la ingesta de alimentos y una reducción estadísticamente significativa del porcentaje de peso corporal al finalizar el estudio, en comparación con los animales tratados con vehículo, de manera dependiente de la dosis. La ingesta acumulada de alimentos se reduce de 264,48 a 91,22 en la dosis más alta probada y la reducción del peso corporal oscila entre un 7 % y un 26 %. Los datos parecen indicar que el compuesto 2 tiene un efecto estadísticamente significativo en la reducción del peso corporal y la ingesta de alimentos en ratas SD normales de forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 4 Eficacia *in vivo* en ratones obesos inducidos por dieta (DIO)

Para investigar el efecto del Compuesto 2 sobre la pérdida de peso, el metabolismo, la composición corporal y la esteatosis hepática, se dosifica crónicamente el Compuesto 2 a ratones C57/B16 DIO.

Se mantienen ratones machos C57/B16 DIO (Taconic) de 24 a 25 semanas de edad, con una dieta rica en calorías a su llegada a las instalaciones (TD95217; Teklad, Madison, WI) y se utilizan en los siguientes estudios. Los animales se alojan individualmente en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 22:00) y libre acceso a comida (TD95217) y agua. Tras un mínimo de 2 semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se distribuyen aleatoriamente en función de su peso corporal, de modo que cada grupo experimental de animales tendría un peso corporal similar. El peso corporal varía entre 40 y 50 gramos.

Todos los grupos contienen cinco ratones. Se disuelven el vehículo o el Compuesto 2 (0,002, 0,006, 0,02, 0,06 y 0,2 mg/kg) en vehículo (PBS) y se administran mediante inyección subcutánea (SC) (10 ml/kg) a ratones DIO alimentados *ad libitum* entre 30 y 90 min antes del inicio del ciclo oscuro cada 3 días durante 21 días. Las inyecciones SC se realizan los días 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 22. El peso corporal y la ingesta de alimentos se miden diariamente durante todo el estudio.

Los cambios absolutos en el peso corporal se calculan restando el peso corporal del mismo animal antes de la primera inyección de molécula. El día 17, los animales ayunan a las 06:00 y a las 13:00 se les extrae sangre para medir la glicemia y la insulina en ayunas. La glicemia se mide con glucómetros AccuChek® (Roche Diabetes Care, Inc.; Indianapolis, IN). La insulina se mide por ELISA (MSD, Rockville, MD). El índice de resistencia a la insulina se calcula mediante la fórmula:

$$\text{HOMA IR} = \text{insulina plasmática en ayunas (mIU/l)} * (\text{glucosa en sangre en ayunas (mmol/l)}) / 22,5$$

El día 24, los animales son sacrificados antes del fotoperíodo oscuro, y los hígados son extraídos y congelados. Los triglicéridos hepáticos, determinados a partir de homogeneizados de hígados recogidos en el momento del sacrificio, y los analitos plasmáticos se miden en el analizador clínico Hitachi Modular P.

Tabla 4: Efecto del tratamiento con el compuesto 2 sobre el peso corporal y la ingesta acumulada de alimentos en ratones DIO el día 16.

Tratamiento	Cambio de peso corporal desde la medición inicial (g)	Ingesta acumulada de alimentos (g)
Vehículo (10 ml/kg, SC)	-0,68±0,14	-0,68±0,94
Compuesto 2 (0,002 mg/kg)	-4,58±0,71.*	33,22±0,99.*
Compuesto 2 (0,006 mg/kg)	-8,64±0,41.*	29,24±1,41.*
Compuesto 2 (0,02 mg/kg)	-11,82±0,57.*	23,00±1,86.*
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	-9,02±0,57.*	23,86±0,96.*
Compuesto 2 (0,2 mg/kg)	-9,08±0,59.*	27,52±1,30.*

Todos los datos se presentan como media ± SEM de 5 animales por grupo. Los valores se presentan como media ± SEM con n = 5. *p<0,05 comparado con el grupo del vehículo; ANOVA de una vía, seguido por el método de Dunnett para comparaciones múltiples.

Tabla 5: Efecto del tratamiento con el compuesto 2 sobre la glucosa sérica, el colesterol, la alanina aminotransferasa (ALT) y los triglicéridos hepáticos en ratones DIO el día 24.

Tratamiento	Glucosa (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	ALT (UI/L)	Triglicéridos hepáticos (mg/g de tejido)
Vehículo (10 ml/kg, SC)	339.18±30,58	271.80,68±12,02	310.80±34,92	210.10±11,82
Compuesto 2 (0,002 mg/kg)	317.52±17,95	220,80-4,89*	231.60±25,39	69,88-18,88*
Compuesto 2 (0,006 mg/kg)	261,00-20,43*	177,00-7,82*	159,60-73,32*	46,56-13,85*
Compuesto 2 (0,02 mg/kg)	223,38-16,02	172,80-18,51*	87,00-13,04*	24,82-8,80*
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	245,94-10,10*	199,20-15,34*	114,60-22,72*	58,90-14,45*
Compuesto 2 (0,2 mg/kg)	241,02-8,88*	167,40-8,72*	112,80-19,15*	34,62-10,88*

Los valores se presentan como media ± SEM con n = 5. *p<0,05 comparado con el grupo del vehículo; ANOVA de una vía, seguido por el método de Dunnett.

Tabla 6: Efecto del tratamiento con el compuesto 2 sobre la glicemia en ayunas, la insulina y el HOMA-IR en ratones DIO el día 17.

Tratamiento	Glucosa en ayunas (mmol/l)	Insulina en ayunas (mIU/L/ml)	HOMA-IR
Vehículo (10 ml/kg, SC)	6.80±0,28	85.64±13,68	25.78±4,13
Compuesto 2 (0,002 mg/kg)	6.64±0,28	45,94±4,66*	13,51±1,32*
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	5,16±0,53*	26,44±2,95*	6,22±1,15*

Todos los datos se presentaron como media ± SEM de 5 animales por grupo del día 17. El análisis estadístico se realizó mediante Mediciones repetidas de ANOVA, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples. Se identificaron diferencias significativas a p<0,05.

El compuesto 2 reduce de forma Dependiente de la dosis el peso corporal y la ingesta de alimentos en ratones machos DIO, lo que indica que podría utilizarse en terapia para inducir la pérdida de peso y para la obesidad (Tabla 4). El compuesto 2 también reduce la glucosa sérica, lo que indica que podría utilizarse en la terapia de la diabetes (Tabla 5). El compuesto 2 reduce aún más el colesterol, lo que indica que podría utilizarse en la terapia de la dislipidemia (Tabla 5). El compuesto 2 mejora la salud del hígado (demostrado por la disminución de la ALT sérica) y reduce los triglicéridos hepáticos, lo que indica que podría utilizarse en la terapia de la EHNA (Tabla 5). Las pruebas de glucosa en sangre y de insulina en ayunas realizadas el día 17 demuestran un aumento de la sensibilidad a la insulina y una reducción del índice de resistencia a la insulina, lo que respalda aún más la posibilidad de utilizar el Compuesto 2 en la terapia de la diabetes (Tabla 6).

Ejemplo 5: Estabilidad de diferentes estructuras Fc-GDF15

La agregación de proteínas en un producto farmacéutico no es deseable porque reduce el rendimiento general de la producción y podría desencadenar una respuesta inmunitaria cuando se administra a los individuos. Así, se prefiere mantener el compuesto en estado monomérico, o en este caso un homodímero unido covalentemente.

Para probar la propensión de diferentes proteínas de fusión GDF15 a agregarse y/o degradarse, pueden expresarse diversas proteínas de fusión Fc-GDF15 en células CHO de mamífero. Las proteínas de fusión Fc-GDF 15 pueden captarse en Mab Select Protein A (GE; Piscataway, NJ) con amortiguador de migración PBS (pH 7,4); brevemente, pueden lavarse brevemente con amortiguador de migración para eliminar el material unido inespecíficamente; y pueden eluirse con ácido acético 20 mM y ácido cítrico 5 mM, pH 3. Se agrupan las fracciones que contienen proteínas Fc-GDF15 y se neutraliza el pH añadiendo 1/10 volúmenes de Tris 1 M pH 8,0.

El conjunto de captura de Proteína A es entonces analizado por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) para

determinar el % de agregado de Alto Peso Molecular (HMW), indicando cuanta agregación había ocurrido. El método de separación SEC se realiza en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 µm, de dimensiones 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil es PBSx1, 350 mM NaCl (pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min. Las muestras iniciales de baja concentración se aplican como inyecciones de 10 µl y se controlan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm. El % de especies LMW indica la estabilidad química o los productos de degradación de pequeño peso molecular de un compuesto.

Tabla 7: Comparación de la estabilidad física y química de diferentes proteínas de fusión Fc-GDF15.

Compuesto	% de HMW	% de LMW
Compuesto 2 (incluido el Fc monomérico)	4,1	2,3
Compuesto 3 (incluido el tándem Fc)	60,8	3,6
Compuesto 4 (incluido el Fc heterodimérico)	2,0	49,1

Una estructura de proteína de fusión Fc-GDF 15 en tándem (dos porciones Fc similares de anticuerpo se unen entre sí de extremo a extremo, conteniendo una región bisagra, y luego se unen a una molécula GDF15 donde las porciones GDF15 luego se autoasocian para crear un dímero), el Compuesto 3 (homodímero de dos moléculas, en donde cada una de las cuales comprende SEQ ID NO:5) tiene un 60,8 % de HMW en comparación con el 4,1 % de HMW del Compuesto 2. Esto sugiere que el Compuesto 2 tiene mejor estabilidad física, con menor agregación y menor riesgo de agregados inmunogénicos que una estructura de proteína de fusión Fc-GDF 15 en tándem.

Un Compuesto 4 (un homodímero de dos moléculas, en donde cada molécula comprende un heterodímero de SEQ ID NO:6 & SEQ ID NO:17) Fc-GDF15 heterodimérico (dos porciones Fc diferentes de un anticuerpo que se asocian entre sí lado a lado y donde una porción Fc (Cadena B, SEQ ID NO:17) se asocia con otra porción Fc que está unida a una molécula GDF15 (Cadena A, SEQ ID NO:6) y donde las porciones de GDF15 se autoasocian para crear un homodímero), tiene un elevado 49,1 % de especies de LMW en comparación con el compuesto 2, que sólo tiene un 2,3 % de LMW, lo que sugiere que el compuesto 2 tiene una mejor estabilidad química y una menor propensión a la escisión química o proteolítica. La estabilidad química y el evitar la degradación ayudan a conservar la potencia de un compuesto durante largos periodos de tiempo. Además, una menor degradación minimiza el riesgo de que los subproductos de la degradación causen más problemas de potencia al interferir con el ingrediente activo en una formulación, o que los subproductos de la degradación se agreguen y causen problemas de inmunogenicidad.

Ejemplo 6: Estabilidad de las mutaciones Fc dobles frente a las simples

La estructura única de la porción Fc de los compuestos del presente documento, con dos mutaciones específicas, exhibe inesperadamente una mejor estabilidad y una mayor solubilidad a altas concentraciones, que una estructura Fc con cualquiera de las mutaciones solas. Se generan dos Fc con una única mutación para interrumpir la asociación CH3/CH3 en el IgG4-Fc y crear una estructura Fc monomérica. El primer mutante único es el compuesto 7, con una glutamina sustituida por una fenilalanina en la posición 405 de una cadena pesada de IgG4 humana de longitud completa, correspondiente a la posición 173 en SEQ ID NO:2 (posición 175 en SEQ ID NO:9). El segundo mutante único generado es el compuesto 8, un Fc con un ácido glutámico sustituido por una tirosina en la posición 407 en una cadena pesada IgG4 humana de longitud completa, correspondiente a la posición 175 en SEQ ID NO:2 (posición 177 en SEQ ID NO:10). También se genera un mutante Fc dual, el Compuesto 5 (SEQ ID NO:7), que contiene ambas mutaciones Fc de los Compuestos 7 y 8. La secuencia del compuesto 5 es la misma que la del compuesto 2, excepto por la presencia de dos aminoácidos adicionales, AP, en el extremo N de la región Fc del compuesto 5. Los compuestos 2, 5, 7 y 8 carecen de la región bisagra de ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:8) para garantizar la formación de la IgG4 Fc monomérica.

Los compuestos de este ejemplo se expresan en células CHO de mamífero, y el medio cosechado se captura en Mab Select Protein A (GE) con amortiguador de migración PBS (pH 7,4); se lava brevemente con amortiguador de migración para eliminar el material unido de forma no específica; y se eluye con ácido acético 20 mM y ácido cítrico 5 mM, pH 3,0. Se agrupan las fracciones que contienen proteínas GDF15 y se neutraliza el pH añadiendo 1/10 de volumen de Tris 1 M con pH 8,0.

Los grupos de captura de proteína A neutralizados se intercambian después en amortiguador en citrato 10 mM pH 5,0 en un concentrador centrífugo Amicon Ultra de 0,5 ml con 10 MWCO. A continuación, se intenta concentrar los mutantes Fc-GDF15 simples y dobles hasta o por encima de 10 mg/ml utilizando el concentrador centrífugo Amicon Ultra de 0,5 ml con 10 MWCO.

Tabla 8: Solubilidad máxima de las fusiones GDF15 a pH 5,0.

Compuesto	Solubilidad máxima a pH 5,0 (mg/ml)	Observaciones visuales
Homodímero del compuesto 7 (SEQ ID NO:9)	1,7	No se pudo alcanzar 10 mg/ml; se observó precipitación durante la concentración
Homodímero del compuesto 8 (SEQ ID NO:10)	6,7	Incapaz de alcanzar 10 mg/ml, precipitación observada durante la concentración
Homodímero del compuesto 5 (SEQ ID NO:7)	9,8	Solución clara
IgG4 monomérica control sólo Fc	12,0	Solución clara

Los resultados muestran que los mutantes Fc simples, los homodímeros del Compuesto 7 y el Compuesto 8, tienen una solubilidad reducida en comparación con el mutante Fc doble, el homodímero del Compuesto 5. El homodímero del compuesto 7 no pudo alcanzar los 10 mg/ml debido a la precipitación y pérdida de material. El homodímero del compuesto 8 muestra una solubilidad mejorada en comparación con el homodímero del compuesto 7; sin embargo, no es capaz de alcanzar los 10 mg/ml debido a la pérdida de material durante el proceso de concentración. El homodímero del compuesto 5, con la novedosa doble mutación en el Fc, conserva la solubilidad a 9,8 mg/ml. Un control monomérico IgG4 sólo Fc es soluble hasta 12 mg/ml.

10 Ejemplo 7: Comparación de la estabilidad química de los enlazadores flexibles o rígidos

Para probar la estabilidad química de los compuestos GDF15 del presente documento, dichos compuestos pueden dializarse durante la noche a 4 °C en los siguientes amortiguadores: Citrato 10 mM, pH6 (C6), citrato 10 mM, pH7 (C7), Tris 10 mM, pH 7,0 (T7), Tris 10 mM, pH 8,0 (T8) o 1x PBS, pH 7,4 (PBS). Para evaluar la estabilidad a largo plazo de las fusiones Fc-GDF15, las soluciones de proteína de 1,0 mg/ml en los amortiguadores respectivos pueden almacenarse a 4 °C, 25 °C y 40 °C durante 4 semanas, y el % de LMW se determina mediante SEC analítica.

El método de separación SEC puede realizarse en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 µm, de dimensiones 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil puede ser PBS, NaCl 350 mM, pH 7,4 a un flujo de 0,5 ml/min. Las muestras iniciales de baja concentración pueden aplicarse como inyecciones de 10 µl y controlarse a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm.

Los cambios en la estabilidad química, medidos por el % de LMW, se evalúan en relación con las muestras de tiempo 0. Según lo determinado por los estudios realizados esencialmente como se ha descrito anteriormente, el % de crecimiento de LMW para los compuestos GDF15 se resume en la Tabla 9.

Los compuestos probados son el Compuesto 2, un homodímero del Compuesto 1 (SEQ ID NO:2), con un enlazador G4-AP10-G4 rígido, un homodímero del Compuesto 5 (SEQ ID NO:7) con un enlazador L5Q flexible (GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ (SEQ ID NO: 12)), y un homodímero del Compuesto 6 (SEQ ID NO:11), con un enlazador G4S-AP10-G4S rígido.

Tabla 9: Crecimiento en % de LMW para compuestos GDF15 a 1 mg/ml determinado por SEC analítico.

	% de crecimiento de LMW a 1 mg/ml tras 4 semanas de almacenamiento a 4 °C, 25 °C y 40 °C								
	Citrato pH 6,0			Citrato pH 7,0 o Tris pH 7,0			Tris pH 8,0 o PBS pH 7,4		
	4 °C.	25 °C.	40 °C.	4 °C.	25 °C.	40 °C.	4 °C.	25 °C.	40 °C.
Compuesto 2 Enlazador: GGGG-AP10-GGGG	0	0	0,75	0	0,36	3,45	0,15	0,99	7,09
Homodímero del compuesto 5 Enlazador: L5Q	0,37	0,81	3,99	0,56	1,8	6,63	0,71	2,8	10,5
Homodímero del compuesto 6 Enlazador: GGGGS-AP10-GGGGS	1,65	0,76	2,7	1,52	1,2	5,76	1,83	1,52	5,65

El enlazador L5Q tiene un % LMW más alto después del almacenamiento a 25 °C y 40 °C que cualquiera de los enlazadores AP10, lo que sugiere una mayor propensión a la degradación química para las proteínas de fusión GDF15 que comprenden un enlazador L5Q flexible, que una proteína que comprende un enlazador AP10 (APAPAPAPAPAPAPAPAPAP; SEQ ID NO:13 rígido). Además, el homodímero del Compuesto 6, con un enlazador que comprende G4S (GGGGS; SEQ ID NO:14), tiene un % de LMW mayor que el Compuesto 2, con un enlazador que comprende G4 (GGGG; SEQ ID NO:15), en la mayoría de las condiciones, lo que sugiere una mayor estabilidad química del Compuesto 2 con su enlazador G4-AP10-G4.

La estabilidad química y física de los compuestos GDF15 con enlazadores rígidos (Compuesto 2 y Compuesto 6) y flexibles (Compuesto 5) puede evaluarse a una concentración elevada de 10 mg/ml. Los compuestos pueden dializarse primero O/N a 4 °C en los siguientes amortiguadores: (a) citrato 10 mM pH 6,5; (b) citrato 10 mM pH 6,5, NaCl 150 mM; y (c) citrato 10 mM pH 6,5, 0,02 % Polisorbato 80. Se añaden excipientes como NaCl 150 mM y Polisorbato 0,02 % a la formulación para comprobar su efecto sobre la estabilidad química y física de las fusiones GDF15. A continuación, los compuestos pueden concentrarse a 10 mg/ml utilizando concentradores Millipore Spin de 10.000 MWCO y 15 ml. Tras la concentración, pueden determinarse el % de HMW y el % de LMW mediante SEC utilizando la proteína concentrada (t=0).

El procedimiento de separación SEC puede realizarse en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 µm, de dimensiones 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil fue PBS, 350 mM de NaCl, pH 7,4 a un flujo de 0,5 ml/min. Se diluyen las muestras de 10 mg/ml a 1 mg/ml en sus respectivos amortiguadores y luego se aplican como inyecciones de 10 µl y se vigilan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm.

Las formulaciones de 10 mg/ml pueden incubarse durante 4 semanas a 4 °C, 25 °C y 40 °C para evaluar la estabilidad a más largo plazo en condiciones de estrés. El % de LMW y el % de HMW pueden ser determinados de nuevo a las 4 semanas (t = 4w) mediante SEC. Los cambios en la estabilidad química (% de LMW) pueden evaluarse en relación con las muestras de tiempo 0.

Tabla 10: Estabilidad química representada como crecimiento en % de LMW para compuestos GDF15 a 10 mg/ml.

	% de crecimiento de LMW a 10 mg/ml tras 4 semanas de almacenamiento a 4 °C, 25 °C y 40 °C								
	Citrato pH 6,5			Citrato pH 6,5 + 150 mM de NaCl			Citrato pH 6,5 + 0,02 % Polisorbato 80		
	4 °C.	25 °C.	40 °C.	4 °C.	25 °C.	40 °C.	4 °C.	25 °C.	40 °C.
Homodímero del compuesto 5 Enlazador: L5Q	0,52	1,03	6,39	0,25	0,86	5,11	0,27	1,04	6,2
Homodímero del compuesto 6 Enlazador: GGGGS-AP10-GGGGS	0	0,2	2,73	0	0,3	2,52	0	0,31	2,8

Tabla 11: Estabilidad física representada como crecimiento en % de HMW para compuestos GDF15 a 10 mg/ml.

	% de crecimiento de HMW a 10 mg/ml tras 4 semanas de almacenamiento a 4, 25 y 40 °C								
	Citrato pH 6,5			Citrato pH 6,5 + 150 mM de NaCl			Citrato pH 6,5 + 0,02 % Polisorbato 80		
	4 °C.	25 °C.	40 °C.	4 °C.	25 °C.	40 °C.	4 °C.	25 °C.	40 °C.
Homodímero del compuesto 5 Enlazador: L5Q	0,06	0,23	3,04	0,05	0,19	7,3	0,1	0,24	3,13
Homodímero del compuesto 6 Enlazador: GGGGS-AP10-GGGGS	0	0,1	2,98	0	0,33	7,18	0	0	2,85

Como se muestra en la Tabla 10, el homodímero del Compuesto 5 a 10 mg/ml, que contiene un enlazador flexible, mostró un mayor nivel de % de LMW que el homodímero del Compuesto 6, con un enlazador rígido, a 25 °C y 40 °C, lo que indica una menor estabilidad química.

5 Como se muestra en la Tabla 11, el homodímero del Compuesto 5 a 10 mg/ml, que contiene un enlazador flexible, mostró un mayor nivel de % de HMW que el homodímero del Compuesto 6, con un enlazador rígido, lo que indica una menor estabilidad física. Una baja estabilidad química y/o física puede provocar precipitación y posibles problemas de inmunogenicidad.

Ejemplo 8: Comportamiento farmacocinético de los compuestos GDF15

10 El comportamiento farmacocinético del Compuesto 2 se prueba en monos. Las concentraciones plasmáticas de los compuestos GDF15 se determinan mediante un procedimiento ELISA en Eli Lilly and Company (Indianápolis, IN). El ELISA sándwich utiliza un anticuerpo policlonal de cabra anti-GDF15 humano (R&D Systems/AF957) o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GDF15 humano/primate (R&D Systems/MAB957) recubierto a 1 o 3 µg/ml como reactivo de captura. A continuación, el compuesto GDF15 se detecta con un anticuerpo pFc-HRP IgG4 antihumano de ratón (Southern Biotech/9190-05) o un anticuerpo Fc-HRP IgG antihumano de ratón (Southern Biotech/9200-05). Las placas se revelan utilizando el sistema de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) (SeraCare/5120), y se apaga la reacción enzimática con TMB Stop Solution (KPL/50-85-04).

15 Se administra a monos macho Cynomolgus una dosis única subcutánea (0,3 mg/kg) del Compuesto 2 en PBS (pH 7,4) a un volumen de 0,5 ml/kg. Se recoge sangre de cada animal antes de la dosis y a las 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408 y 504 horas después de la dosis, para la caracterización farmacocinética.

20 Tabla 12: Parámetros farmacocinéticos individuales y medios tras una dosis única subcutánea de 0,3 mg/kg en monos cynomolgus machos.

Compuesto (Dosis)	Animal	t _{1/2} (hr)	T _{máx} (hr)	C _{max} (µg/ml)	AUC _{0-inf} (hr*µg/ml)	CL/F (ml/min/kg)
Compuesto 2 (0,3 mg/kg)	1	118	48	1,96	206	1,45
	2	116	48	2,44	184	1,63
	Media	117	48	2,20	195	1,54

Abreviaturas: AUC_{0-inf} = área bajo la curva desde el tiempo 0 horas hasta el infinito, CL/F = acceso/biodisponibilidad, T_{máx} = tiempo hasta la concentración máxima, C_{máx} = concentración plasmática máxima observada, t_{1/2} = semivida.

25 Los datos de la Tabla 12 muestran que la t_{1/2} en monos se mide en 117 horas. Se trata de una t_{1/2} inesperadamente larga para una molécula Fc monomérica. Además, el perfil farmacocinético en monos es estable durante un periodo de tiempo prolongado, lo que sugiere que el perfil farmacocinético del compuesto 2 en humanos también podría ser demostrablemente estable durante un periodo de tiempo prolongado en el intervalo terapéutico, para permitir un nivel estable del fármaco en el torrente sanguíneo con una dosis semanal.

30 Secuencias

[0077] En la presente divulgación se hace referencia a las siguientes secuencias de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos, que se proporcionan a continuación como referencia.

35 SEQ ID NO:1 - GDF15 humano maduro

ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR

AANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLAK

DHCI

SEQ ID NO:2 - Secuencia artificial

EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PVLDSDFGQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGGGG
GAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGGGGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWAD
WVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNP
MVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

5

SEQ ID NO:3 - Secuencia líder

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

SEQ ID NO:4 - Secuencia artificial

QTNNCTYLREQCLRANGCKHAWRVMEDACNDSDPGDPCKMRNSSYCNLSIQY
LVESNFQFKECLCTDDFYCTVNKLLGKKCINKSDNVKEDKFKWNLTRSHHGFK
GMWSCLEVAEACVGDVVCNAQLASYLKACANGNPCDLKQCQAIRFFYQNI
FNIAQMLAFCDCAQSDIPCQSQSKEALHSKTCAVNMVPPPTCLSVIRSCQND
ELCR RHYRTFQSKCWQRVTRKCHEDENCISTLSKQDLTCSGSDDCCKAAYID
ILGTVLQV QCTCRTITQSEESLCKIFQHMLHRKSCFNYP TLSNVKGMALYTR
KHANKHHHHH H

10

SEQ ID NO:5 - Secuencia artificial

ERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDFGQLESRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP
IEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDFGQLESRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGGGGGSGGGGASARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS
PREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQ
KTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

15

SEQ ID NO:6 - Secuencia artificial

DKTHTCPPCPALGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTKISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGNGTHCPLGPGRCCRLHTV
RASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP
APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:7 - Secuencia artificial

5 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:8 - Fragmento Fc

10 ESKYGPPCPPCP

SEQ ID NO:9 - Secuencia artificial

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFQLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:10 - Secuencia artificial

15 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGG
GGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
WADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPAS
YNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:11 - Secuencia artificial

20

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
GGGSAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLLAKDCHCI

5

SEQ ID NO:12 - Secuencia artificial

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

10

SEQ ID NO:13 - Secuencia artificial

APAPAPAPAPAPAPAPAPAP

15

SEQ ID NO:14 - Secuencia artificial

GGGS

20

SEQ ID NO:15 - Secuencia artificial

GGG

SEQ ID NO:16 - Secuencia artificial

gaggccgcccggggaccatcagttcttctgtccccccaaaaccaaggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacg
tgcgtggtggtgacgtgagccaggaagacccccagggtccagttcaactggtacgtggtgaggtgcataatgccaa
gacaaagcccgaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaac
ggcaaggagtacaagtcaaggctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggcagc
cccagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctcaa
aggcttacccccagcagatcggcgtggagtggaaagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtg
ctggactccgacggctcctccagctcgagagcaggtaaccgtggacaagagcaggtggcagggggaatgtcttctcatg
ctccgtgatgatgaggtctgcacaactactacacagaagagcctcctctctctgggtggcgggtggtggagctccagc
cccagctcctgctcctgcaccagcacctgccccgtccagcaccgcacctggaggagggggcgggtgacctgtcccctg
ggcctggccggtgtgacagactgcatacagtcgggcccctccctggaagacctgggtggcagattgggtgctcctcctgc
gaggtcaggtgacctgtgattggggctgtccctcacaattcgcgagtaaatgcacgcccaaatcaaacctccctgca
ccggctaaaccggatactgttctgctcctgctgctgcccagatcctacaacccatggtgctgatccagaagacggataca
ggggtgtcactgcagacctatgatgacctcctggccaaagattgccactgtatc

25

SEQ ID NO:17 - Secuencia artificial

DKTHTCPPCPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende SEQ ID NO:2.
- 5 2. Un compuesto que consiste en SEQ ID NO:2.
3. Un homodímero que comprende dos compuestos de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde los compuestos están unidos mediante al menos un enlace disulfuro entre cadenas entre un residuo de cisteína del primer compuesto y un residuo de cisteína del segundo compuesto.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o un homodímero de la reivindicación 3 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15 5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en terapia.
6. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el homodímero de la reivindicación 3 para su uso en la inducción de la pérdida de peso.
- 20 7. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el homodímero de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.
8. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el homodímero de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la obesidad.
- 25 9. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el homodímero de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la dislipidemia.
- 30 10. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el homodímero de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la EHNA.
11. El compuesto u homodímero para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el compuesto u homodímero es administrado una vez por semana.