

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 984**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 38/26** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2018 PCT/CN2018/078925**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18166461**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2018 E 18768644 (9)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 3596130**

54 Título: **Proteínas de fusión de diana doble que comprenden la porción Fc de una inmunoglobulina**

30 Prioridad:

**14.03.2017 CN 201710148158**  
**08.02.2018 CN 201810129427**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.04.2025**

73 Titular/es:

**SUNSHINE LAKE PHARMA CO., LTD. (100.00%)**  
**Northern Industrial Area, Songshan Lake**  
**Dongguan, Guangdong 523000, CN**

72 Inventor/es:

**CHEN, CHAO;**  
**LIN, SHUSHAN;**  
**LI, YU;**  
**CHEN, XIAOFENG;**  
**LIU, LIANG y**  
**FU, ZHENG**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

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

ES 3 014 984 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**

Proteínas de fusión de diana doble que comprenden la porción Fc de una inmunoglobulina

Referencia cruzada con la solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica prioridad y beneficios de la solicitud de patente china No. 201710148158.7, presentada ante la oficina estatal de propiedad intelectual el 14 de marzo de 2017; y la solicitud de patente china No. 201810129427.X, presentada ante la oficina estatal de propiedad intelectual el 8 de febrero de 2018.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden el factor de crecimiento de fibroblasto 21 (FGF21) y el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), conectados a través de una porción Fc de inmunoglobulina, y a usos de las proteínas de fusión para tratar enfermedades metabólicas.

Antecedentes de la invención

15 En la actualidad, existen tres categorías de fármacos para el tratamiento de la diabetes: medicamentos orales de moléculas pequeñas, insulina y fármacos agonistas del receptor GLP-1. El tratamiento a largo plazo con fármacos de moléculas pequeñas produce efectos secundarios evidentes y el control glucémico post diabético no es satisfactorio. El tratamiento de la diabetes con insulina requiere múltiples inyecciones (al menos una vez al día) y la hipoglucemia se desencadena fácilmente por diferencias en las dosis individuales. Un solo agonista del receptor GLP-1 no es un agente de primera línea y tiene una eficacia limitada en las complicaciones cardiovasculares causadas por el metabolismo anormal de la diabetes.

20 El péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) es un tipo de incretina secretada por las células L intestinales. Este estimula las células  $\beta$  de los islotes para que secreten insulina, manteniendo el equilibrio de insulina en los pacientes. El GLP-1 natural sólo sobrevive solamente hasta 2 minutos in vitro y, por lo tanto, no es eficaz como fármaco. Desde hace algunos años, varios partidos, incluyendo Eli Lilly, Novo Nordisk, GSK, han buscado competitivamente transformar la proteína con la finalidad de obtener una clase de fármacos hipoglucémicos GLP-1 de acción prolongada. Actualmente, los fármacos GLP-1 de acción más prolongada, tal como dulaglutida, se pueden administrar una vez por semana fusionando un fragmento de anticuerpo a la proteína GLP-1. Sin embargo, los estudios encuentran que la curva de reducción de glucosa de dulaglutida no es estable y la glucosa en sangre comienza a aumentar al día siguiente del tratamiento. Por lo tanto, esta situación no es ideal para controlar la diabetes y puede conducir a diversas complicaciones.

30 La diabetes tipo 2 tiene dos características principales: resistencia a la insulina periférica y secreción alterada de insulina dependiente de la glucosa por parte de las células beta pancreáticas. Los trastornos metabólicos como la diabetes suelen estar causados por una variedad de factores complejos, por lo que el tratamiento de múltiples vías metabólicas se considera mucho más ventajoso.

35 El factor de crecimiento de fibroblasto 21 (FGF21) es una citocina descubierta recientemente. Puede estimular los receptores GLUT1 y promover el transporte de glucosa a las células, por lo que se puede utilizar como un fármaco para tratar la diabetes. Sin embargo, el FGF21 se enfrenta a un gran problema cuando se trata de propiedades medicinales. El FGF21 tiene una vida media corta, alrededor de una hora en un modelo de ratón (pero la bioactividad máxima se puede mantener durante más de seis horas). La razón por la que FGF21 se degrada rápidamente se debe a las proteasas del cuerpo y a su propensión a formar agregados in vitro, lo que resulta en una inmunogenicidad que es perjudicial para la extensión de la vida media.

40 En los últimos años se han realizado diversos intentos para aumentar la estabilidad de FGF21 in vivo con la finalidad de desarrollar el uso farmacéutico de FGF21, tal como mutar en sitios diferentes, insertar aminoácidos/cadenas grasas o eliminar algunos aminoácidos que se realizaron con base en las secuencias nativas de FGF21, tal como las publicadas en WO 2003011213, WO 2005072769, WO 2005061712, WO 2006065582, WO 2010065439, WO2013052311, WO 2013188182, WO 2013033452, WO 2005091944, WO 45 2012066075, WO 2013188181.

Sumario

50 La presente divulgación proporciona una proteína de fusión de diana doble que comprende GLP-1 y FGF21, con sitios de mutación diferentes de las proteínas de fusión divulgadas previamente. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la proteína de fusión de diana doble de la presente invención tiene mejor estabilidad y una vida media significativamente prolongada, y exhibe efectos sinérgicos en la reducción del azúcar en sangre, los lípidos, el peso, y así sucesivamente.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión, la cual comprende o consiste en un primer polipéptido: GLP-1 o un análogo del mismo, un segundo polipéptido: una porción Fc de IgG4 y un tercer polipéptido: FGF21 o una variante del mismo, en el que el primer polipéptido está unido al segundo

## ES 3 014 984 T3

- polipéptido a través de un primer enlazador y el tercer polipéptido está unido al segundo polipéptido a través de un segundo enlazador, y en el que la serina en la posición 228 de la porción Fc de IgG4 se reemplaza por prolina y la arginina en la posición 409 de la porción Fc de IgG4 se reemplaza por lisina, en comparación con una porción Fc de IgG4 de tipo silvestre. Por lo tanto, se aumenta la seguridad y la estabilidad de la proteína de fusión, lo que conduce a una vida media significativamente prolongada.
- 5 El primer polipéptido, el análogo de GLP-1, comprende la secuencia nativa de GLP-1 (SEQ ID NO: 14) que tiene de 1 a 10 (tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, prolongando así la vida media de GLP-1 in vivo, mientras que conserva o mejora la actividad biológica de GLP-1.
- 10 En algunas realizaciones, el análogo de GLP-1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HX<sub>1</sub>EGTFTSDV SSYLEX<sub>2</sub>QAAK EFlAWLX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub> X<sub>6</sub>), en el que X<sub>1</sub> se selecciona de G o V; X<sub>2</sub> se selecciona de E o G; X<sub>3</sub> se selecciona de V o K; X<sub>4</sub> se selecciona de K o N; X<sub>5</sub> se selecciona de G o E; X<sub>6</sub> se selecciona de G o P o está ausente.
- 15 En otras realizaciones, el análogo de GLP-1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- El segundo polipéptido, en algunas realizaciones, la porción Fc de IgG4 comprende adicionalmente una o más mutaciones seleccionadas de las siguientes: E233P, F234V o F234A, L235E o L235A, N297A, K447 en comparación con una porción Fc de IgG4 de tipo silvestre.
- 20 En otras realizaciones, la porción Fc de IgG4 comprende una cualquiera de las siguientes combinaciones de mutaciones:
- 1) S228P y R409K;
  - 2) S228P, E233P y R409K;
  - 3) S228P, N297A y R409K;
  - 4) S228P, F234A, L235A y R409K;
  - 25 5) S228P, F234V, L235E y R409K; y
  - 6) S228P, F234A, L235A, R409K y K447, en comparación con una porción Fc de IgG4 de tipo silvestre.
- En aún otras realizaciones, la porción Fc de IgG4 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 30 El tercer polipéptido, la variante de FGF21, comprende la secuencia nativa de FGF21 que tiene una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, prolongando así la vida media in vivo de FGF21 y preservando o mejorando la actividad biológica de FGF21.
- En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende al menos una mutación de aminoácido en la posición 170 o la posición 171 o la posición 172; la mutación del aminoácido en la posición 170 se selecciona del grupo que consiste en G170E, G170A, G170C, G170D, G170N y G170S; la mutación del aminoácido en la posición 171 se selecciona del grupo que consiste en P171A, P171E, P171H, P171Q, P171T, P171Y, P171W, P171C, P171G, P171S y P171T; la mutación del aminoácido en la posición 172 se selecciona del grupo que consiste en S172L, S172I, S172V, S172A y S172M. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 170 se selecciona del grupo que consiste en G170E, G170A, G170D y G170S; la mutación del aminoácido en la posición 171 se selecciona del grupo que consiste en P171A, P171E, P171Q, P171W, P171C, P171G y P171T; la mutación del aminoácido en la posición 172 se selecciona del grupo que consiste en S172L, S172V y S172M. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 170 se selecciona del grupo que consiste en G170E y G170A; la mutación del aminoácido en la posición 171 se selecciona del grupo que consiste en P171A, P171C y P171 G; la mutación del aminoácido en la posición 172 es S172L.
- 35 En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 45, 98, 100, 118, 134, 150, 151, 152, 167, 175, 179 y 180. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 45 se selecciona del grupo que consiste en A45K, A45R, A45E y A45Q; la mutación del aminoácido en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D, L98R, L98E, L98Q, L98K y L98T; la mutación del aminoácido en la posición 100 es L100K; la mutación del aminoácido en la posición 118 es L118C; el aminoácido en la posición 134 es A134C; la mutación del aminoácido en la posición 150 es P150A; la mutación del aminoácido en la posición 151 es G151A; el aminoácido en la posición 152 es I152V; la mutación del aminoácido en la posición 167 se selecciona del grupo que consiste en S167H, S167C y S167R; la mutación del aminoácido en la posición 175 se selecciona del grupo que consiste en R175L, R175H y R175P; el aminoácido en la posición 179 se selecciona del grupo
- 45
- 50

## ES 3 014 984 T3

que consiste en Y179S, Y179A e Y179F; la mutación del aminoácido en la posición 180 se selecciona del grupo que consiste en A 180S, A 180E y A180G.

5 En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 45, 98, 100, 167, 175, 179 y 180. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 45 se selecciona del grupo que consiste en A45K, A45R, A45E y A45Q; la mutación del aminoácido en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D, L98R, L98E, L98Q, L98K y L98T; la mutación del aminoácido en la posición 100 es L100K; la mutación del aminoácido en la posición 167 se selecciona del grupo que consiste en S167H y S167C; la mutación del aminoácido en la posición 175 se selecciona del grupo que consiste en R175L y R175H; el aminoácido en la posición 179 se selecciona del grupo que consiste en Y179S, Y179A e Y179F; la mutación del aminoácido en la posición 180 se selecciona del grupo que consiste en A 180S, A 180E y A180G.

15 En otras realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 45, 98, 167, 175, 179 y 180. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 45 se selecciona del grupo que consiste en A45K, A45R, A45E y A45Q; la mutación del aminoácido en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D, L98R, L98E, L98Q, L98K y L98T; la mutación del aminoácido en la posición 167 se selecciona del grupo que consiste en S167H y S167C; la mutación del aminoácido en la posición 175 se selecciona del grupo que consiste en R175L y R175H; el aminoácido en la posición 179 se selecciona del grupo que consiste en Y179S, Y179A e Y179F; la mutación del aminoácido en la posición 180 se selecciona del grupo que consiste en A 180S, A 180E y A180G.

20 En otras realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 98, 167, 175 y 179. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D, L98R, L98E y L98K; la mutación del aminoácido en la posición 167 se selecciona del grupo que consiste en S167H y S167C; el aminoácido en la posición 175 se selecciona del grupo que consiste en: R175L, R175H; la mutación del aminoácido en la posición 179 se selecciona del grupo que consiste en Y179S e Y179F.

30 En otras realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 98, 167, 175 y 179. En algunas realizaciones, la mutación del aminoácido en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D y L98R; la mutación del aminoácido en la posición 167 es S167H; el aminoácido en la posición 175 es R175L; la mutación del aminoácido en la posición 179 es Y179F.

35 En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende al menos mutaciones de aminoácidos en uno o más sitios de 98 o 171, en el que la mutación del aminoácido en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D y L98R; la mutación del aminoácido en la posición 170 se selecciona del grupo que consiste en P171A y P171G. En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 167, 175 y 179, en el que la mutación del aminoácido en la posición 167 se selecciona del grupo que consiste en S167H y S167C; la mutación del aminoácido en la posición 175 se selecciona del grupo que consiste en R175L, R175H y R175P; el aminoácido en la posición 179 se selecciona del grupo que consiste en Y179S e Y179F.

40 En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende al menos mutaciones de aminoácidos en uno o más sitios de 98 o 171, en el que, la mutación del aminoácido en la posición 98 es L98R; la mutación del aminoácido en la posición 170 se selecciona del grupo que consiste en P171A y P171G. En algunas realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 167, 175 y 179, en el que la mutación del aminoácido en la posición 167 es S167H; la mutación del aminoácido en la posición 175 es R175L; el aminoácido en la posición 179 es Y179F.

45 En otras realizaciones, la variante de FGF21 comprende una cualquiera de las siguientes combinaciones de mutaciones:

1) L98R y P171G;

2) L98R y P171A;

50 3) L98R, P171G e Y179F;

4) L98R, P171G y A180E;

5) L98R, G170E, P171A y S172L;

6) L98R, S167H y P171A; y

7) L98R, S167H, P171A y R175L.

En aún otras realizaciones, la variante de FGF21 comprende adicionalmente:

- a) truncamiento del amino terminal de no más de 8 residuos de aminoácidos;
- b) truncamiento del carboxilo terminal de no más de 12 residuos de aminoácidos;
- 5 c) truncamiento del amino terminal de no más de 8 residuos de aminoácidos y truncamiento del carboxilo terminal de no más de 12 residuos de aminoácidos; o
- d) extensión del carboxilo terminal de no más de 6 residuos de aminoácidos.

En la presente invención, el primer polipéptido y el tercer polipéptido se fusionan respectivamente con la porción Fc de IgG4 a través de un primer enlazador y un segundo enlazador, y el primer enlazador y/o el segundo enlazador comprenden un polipéptido de 5 a 50 residuos de aminoácidos, y el polipéptido comprende al menos 10 50% de G. En algunas realizaciones, el primer enlazador y el segundo enlazador comprenden cada uno independientemente 1, 2 o 3 polipéptidos ricos en G. En otras realizaciones, el primer enlazador y el segundo enlazador se seleccionan cada uno independientemente de GGGGSGGGGS o GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13) o GGGGSGGGGSGGGGSA.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión es una proteína de fusión homodimérica.

15 En algunas realizaciones, la proteína de fusión es una proteína de fusión no homodimérica.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican para las proteínas de fusión de la invención.

En un aspecto adicional de la invención, también se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la invención.

20 En un aspecto adicional de la invención, también se proporciona una célula hospedera que comprende un vector de la invención.

En un aspecto adicional de la invención, también se proporciona un método para preparar una proteína de fusión de la invención, en el que el método comprende expresar un vector de la invención en una célula hospedera.

25 En otro aspecto de la presente invención, también se proporciona una composición (tal como una composición farmacéutica) que comprende la proteína de fusión de la presente invención y, opcionalmente, uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Dichos adyuvantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, portadores, excipientes, diluyentes, vehículos y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables requeridos en preparaciones farmacéuticas, o cualquier combinación de los mismos.

30 Las proteínas de fusión o composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las enfermedades metabólicas se pueden seleccionar de diabetes, obesidad y esteatosis hepática.

En otro aspecto de la presente invención, también se proporciona el uso de la proteína de fusión de la presente invención en la preparación de una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición 35 farmacéutica se utiliza para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Por ejemplo, las enfermedades metabólicas se pueden seleccionar de diabetes, obesidad y esteatosis hepática.

En otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un método para tratar enfermedades metabólicas, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión o composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, las enfermedades 40 metabólicas se pueden seleccionar de diabetes, obesidad y esteatosis hepática.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión o una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades metabólicas. La enfermedad metabólica se puede seleccionar de diabetes, obesidad y esteatosis hepática.

45 La proteína de fusión proporcionada en la presente memoria tiene las siguientes ventajas: la proteína de fusión tiene una estabilidad mejorada y es más segura debido a que evita la disociación del dímero y, por lo tanto, evita la combinación aleatoria con el anticuerpo en el cuerpo; la proteína de fusión tiene una vida media más larga, el período de administración es mayor a una semana y aumenta el cumplimiento del paciente; no desencadena el efecto ADCC o CDC. En otro aspecto, la proteína de fusión homodimérica que comprende el primer polipéptido, el segundo polipéptido y el tercer polipéptido proporcionados en la presente memoria tienen 50 ventajas únicas que incluyen una buena actividad biológica en enfermedades metabólicas, un efecto hipoglucémico estable debido al efecto sinérgico único ejercido por el primer polipéptido y el tercer polipéptido, y otras actividades biológicas tales como buena hipolipemia, pérdida de peso, etc.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de una proteína de fusión homodimérica en una realización.

La figura 2 muestra gráficas de concentración de AMPc como una función de dulaglutida o D3F1 detectados utilizando un modelo celular de GLP-1R.

5 La figura 3 muestra curvas de calorimetría diferencial de barrido microcalorimétrico de las proteínas de fusión D1F1, D1F2, D6F1 y D7F1.

La figura 4 muestra los niveles de glucosa en sangre después de la administración de dulaglutida, S1F1 y D1F1 en el modelo de ratón db/db.

10 La figura 5 muestra los niveles de glucosa en sangre después de la administración de las proteínas de fusión D1F1, D2F1 y D7F1 en el modo de ratón db/db.

La figura 6 muestra los efectos hipoglucémicos después de la administración de las proteínas de fusión D3F1, D4F1 y DSF1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 7 muestra los efectos de la reducción del colesterol total después de la administración de dulaglutida, S1F1 y D1F1 en el modelo de ratón db/db.

15 La figura 8 muestra los efectos de los triglicéridos reducidos después de la administración de dulaglutida, S1F1 y D1F1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 9 muestra los efectos de los triglicéridos reducidos después de la administración de las proteínas de fusión D1F2, D2F1 y D7F1 en el modelo de ratón db/db.

20 La figura 10 muestra los efectos de reducción del colesterol total después de la administración de las proteínas de fusión D1F2, D2F1 y D7F1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 11 muestra los efectos de las lipoproteínas de alta densidad reducidas después de la administración de las proteínas de fusión D1F1, D2F1 y D7F1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 12 muestra los efectos de las lipoproteínas de baja densidad reducidas después de la administración de las proteínas de fusión D1F1, D2F1 y D7F1 en el modelo de ratón db/db.

25 La figura 13 muestra los efectos de los triglicéridos reducidos después de la administración de las proteínas de fusión D3F1, D4F1, D5F1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 14 muestra los efectos de la reducción del colesterol total después de la administración de las proteínas de fusión D3F1, D4F1 y DSF1 en el modelo de ratón db/db.

30 La figura 15 muestra los efectos de las lipoproteínas de baja densidad reducidas después de la administración de las proteínas de fusión D3F1, D4F1 y D5F1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 16 muestra los efectos de la reducción de peso después de la administración de dulaglutida, S1F1 y D1F1 en el modelo de ratón db/db.

La figura 17 muestra los efectos hipoglucémicos después de la administración de dulaglutida y DSF1 en el modelo de ratón ob/ob.

35 La figura 18 muestra la concentración de glucosa en sangre después de la administración de dulaglutida y D5F1 después de 16 horas de ayuno en el modelo de ratón ob/ob.

La figura 19 muestra los efectos de la mejora de esteatosis hepática después de la administración de dulaglutida y D5F1 en el modelo de ratón ob/ob.

**Ejemplos**

40 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe de entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferibles de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración, y en que muchos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

45 Definición de la terminología

Tal como se utiliza en la presente memoria, "secuencia de GLP-1 nativa" se refiere a una secuencia de GLP-1 nativa (7-37) con actividad biológica que se deriva de una secuencia GLP-1 de origen natural mediante la

escisión de un péptido 6 N terminal. La secuencia nativa de GLP-1, es decir, la secuencia nativa de GLP-1 (7-37), es: HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR G (SEQ ID NO: 14).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "actividad biológica de GLP-1" se refiere a una variedad de efectos biológicos inducidos por GLP-1, tal como estimular la secreción de insulina, inhibir la secreción de glucagón, inhibir el vaciamiento gástrico, inhibir la motilidad gástrica o intestinal e inducir la pérdida de peso. Una característica sorprendente de GLP-1 es que puede estimular la secreción de insulina sin los riesgos asociados con la hipoglucemia.

10 La "porción Fc" descrita en la presente memoria consiste en una región de bisagra de un anticuerpo, estructuras de región constante CH2 y CH3. El anticuerpo comprende dos fracciones funcionalmente independientes, un dominio variable llamado "Fab" que se une a un antígeno y un dominio constante llamado "Fc" que está involucrado en funciones efectoras (por ejemplo, activación del complemento y ataque mediante fagocitos). El Fc tiene una vida media sérica larga, mientras que Fab tiene una vida corta (Capon et al, 1989, Nature 337: 525-31). Cuando se enlaza a una proteína terapéutica, el dominio Fc puede proporcionar vidas medias más largas o incorporar tales funciones como la unión al receptor Fc, la unión a la proteína A, la fijación del complemento o incluso la transferencia placentaria (Capon et al., 1989). El término "porción Fc" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a secuencias de porciones Fc de tipo silvestre derivadas de anticuerpos naturales (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de humano) y también abarca sus variantes. Las variantes pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos como las que se divulgan en la presente memoria. En algunas realizaciones, las variantes de la porción Fc mantienen la actividad de la porción Fc de tipo silvestre, tal como la unión a un receptor Fc.

Los números de aminoácidos de la porción Fc de IgG4 descrita en la presente memoria están numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU, por ejemplo, "S228P" significa que la serina en la posición 228 de acuerdo con el sistema de numeración EU está reemplazada por prolina; "K447" significa que la lisina en la posición 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU está eliminada o ausente.

25 La secuencia de tipo silvestre de FGF21 contiene 209 aminoácidos con el número de secuencia de referencia de NCBI NP\_061986.1; una secuencia de FGF21 madura contiene 181 aminoácidos y carece de una secuencia líder que contiene el tipo silvestre de FGF21. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "secuencia nativa de FGF21" se refiere a la secuencia madura de FGF21 con la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15), la "variante de FGF21" descrita en la presente memoria es un polipéptido mutante que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos de FGF21 (SEQ ID NO: 15), los números de los sitios de mutación de aminoácidos están numerados en la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 15). La secuencia de aminoácidos de la variante de FGF21 difiere de la secuencia de aminoácidos de FGF21 nativa en uno o más aminoácidos. Las variantes de FGF21 se pueden obtener mediante la modificación con aminoácidos naturales o no naturales en posiciones particulares en el polipéptido FGF21 nativo; dichas modificaciones incluyen la inserción, reemplazo o delección de uno o más aminoácidos conservados o no conservados en una posición particular, así como la introducción de estructuras que no son de aminoácidos en posiciones específicas.

**SEQ ID NO: 15: HPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDTG**

**VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP**

**EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPARFLPLP**

**GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYA S**

40 Las variantes de FGF-21 pueden comprender adicional o alternativamente la delección de aminoácidos, que pueden ser truncamientos N terminales, truncamientos C terminales o deleciones internas o cualquier combinación de las mismas. Estas variantes que comprenden truncamiento N terminal, truncamiento C terminal y/o delección interna se denominan como "variantes de delección" o "fragmentos" en el contexto de la presente invención. Los términos "variantes de delección" y "fragmentos" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Los fragmentos pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes de empalme) o construidos artificialmente, por ejemplo, a través de medios genéticos.

45 Las "sustituciones conservadas de aminoácidos" pueden incluir residuos de un residuo de aminoácido nativo (es decir, un residuo presente en una posición determinada en la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo silvestre) reemplazado por un residuo no nativo (es decir, un residuo que no está presente en una posición determinada en la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo silvestre), de modo que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga de los residuos de aminoácidos en esta posición. Las sustituciones conservadas de aminoácidos también incluyen residuos de aminoácidos que no se producen de forma natural y que comúnmente se incorporan mediante síntesis química de péptidos en lugar de mediante una síntesis del sistema biológico. Éstos incluyen peptidomiméticos y otras formas reversas de la porción del aminoácido.

## ES 3 014 984 T3

Los residuos naturales se pueden agrupar en las siguientes clases con base en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) Hidrofóbico: norleucina, M, A, V, L, I;
- (2) Hidrofilicidad neutra: C, S, T;
- 5 (3) Ácido: D, E;
- (4) Alcalino: N, Q, H, K, R;
- (5) Residuos que afectan la orientación de la cadena: G, P; y
- (6) Aromático: W, Y, F.

10 Las sustituciones conservadas pueden incluir el intercambio de un miembro de estas categorías por otro miembro de la misma categoría.

En la siguiente tabla se muestran algunas sustituciones conservadas de aminoácidos:

Aminoácido	Sustituciones conservadas de aminoácidos
Ala	D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, Orn, D-Om
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cys	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Glu	D-Glu, Asp, D-Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala
Ile	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leu	D-Leu, Val, D-Val, Met, D-Met, Ile, D-Ile
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Om
Met	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Phe	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Pro	D-Pro
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Alternativamente, la siguiente tabla enlista ejemplos de sustituciones conservadas de aminoácidos, 0 o más representa que dos aminoácidos son sustituciones conservadas de aminoácidos entre sí:

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

5 Cuando se forma la proteína de fusión de la invención, se puede utilizar, aunque no necesariamente, un enlazador o un conector. Cuando está presente un enlazador, su estructura química puede ser flexible dado que funciona principalmente como un espaciador. Los enlazadores pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones de la invención, el enlazador consta de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos naturales. En diversas realizaciones, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan de los aminoácidos glicina, serina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En algunas realizaciones, el enlazador consta de múltiples aminoácidos que no tienen impedimentos espaciales. En otras realizaciones, los aminoácidos sin impedimentos espaciales consisten en glicina y alanina. Los polipéptidos ricos en G de la presente invención se pueden seleccionar de (G) 3-S, es decir, "GGGS", (G) 4-S, es decir, "GGGGS" y (G) 5-S, es decir, "GGGGGS". En algunas realizaciones, el enlazador comprende GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS o GGGGSGGGGS. Otros enlaces adecuados incluyen: GGGGSGGGGS, GGGKGGG, GGGNGSGG, GGGCGGGG y GPNGG. Aunque se descubrió que un enlazador de 15 residuos de aminoácidos desempeña un papel particularmente bueno para la proteína de fusión de diana doble, la presente invención contempla enlazadores de cualquier longitud o composición.

10 Los enlazadores descritos en la presente memoria son ejemplares, y el enlazador divulgado en la presente memoria puede ser mucho más largo y puede contener otros residuos. Los enlazadores en la presente invención también pueden ser enlazadores no peptídicos. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador alquilo, tal como -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-C(O)-, en el que s = 2-20. Estos enlazadores alquilo se pueden sustituir adicionalmente con cualquier grupo no estéricamente impedido, incluyendo, pero no limitado a, alquilo inferior (por ejemplo, C1-C6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH<sub>2</sub> o fenilo. Un enlazador no peptídico ejemplar también puede ser un enlazador de polietilenglicol, en el que el enlazador tiene un peso molecular de 100-5000 kD, tal como 100-500 kD.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, se define "una o más" sustituciones de aminoácidos donde "más" significa mayor que uno, tal como de 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 5, o tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

Los términos "primero" y "segundo" descritos en este artículo son únicamente para el propósito de distinguir la descripción y no tienen ningún significado especial.

30 El "efecto ADCC" descrito en la presente memoria es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); las subclases de IgG de humano (G1, G2, G3, G4) tienen diferentes actividades biológicas (denominadas como funciones efectoras). Estas funciones efectoras a menudo están mediadas por la interacción con el receptor

FcγR (FcγR) o por la unión al subcomponente del complemento 1 (C1q), en el que el subcomponente del complemento 1 reconoce y se une a la cadena pesada de inmunoglobulina G o inmunoglobulina M, iniciando la vía clásica del complemento. La unión a FcγR puede resultar en una citólisis mediada por células dependiente del anticuerpo, mientras que la unión a factores del complemento puede resultar en una citólisis mediada por el complemento, es decir, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" generalmente significa los elementos recitados, pero sin excluir otros elementos.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente y, en su sentido más amplio, se refieren a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades se pueden unir mediante enlaces peptídicos. En otra realización, las subunidades pueden estar unidas por otros enlaces, tales como ésteres, éteres, grupos amino y similares. La proteína o el polipéptido debe contener al menos dos aminoácidos y no hay límite para el número máximo de aminoácidos que pueden formar la secuencia de la proteína o del péptido. El término "aminoácido" como se utiliza en la presente memoria se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo los isómeros ópticos D y L de aminoácidos, tal como la glicina, los isómeros ópticos D y L, los análogos de aminoácidos y los miméticos de péptidos.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refieren a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar mediante la comparación de las posiciones en cada secuencia que se pueden alinear con fines comparativos. Cuando las posiciones en las secuencias comparadas están ocupadas por la misma base o aminoácido, estas moléculas son homólogas en esa posición. El grado de homología entre secuencias varía con el número de coincidencias o posiciones homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, o alternativamente menos del 25% de identidad con una de las secuencias de la divulgación.

A lo largo de esta memoria descriptiva se utiliza el término "al menos 80% de identidad de secuencia" con respecto a las comparaciones de secuencias de polipéptidos. La expresión generalmente se refiere a al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con cada secuencia de referencia.

Cuando se utiliza en relación con un valor numérico, el término "alrededor de" pretende incluir valores numéricos en el intervalo que tiene un límite inferior de 5% menos que el valor indicado y un límite superior de 5% mayor que el valor indicado.

El término "proteína de fusión" generalmente se refiere a una proteína resultante de dos o más proteínas o polipéptidos. Un gen o una molécula de ácido nucleico que codifica para dos o más proteínas o polipéptidos se pueden unir para formar un gen de fusión o una molécula de ácido nucleico de fusión. El gen de fusión o la molécula de ácido nucleico de fusión puede codificar para la proteína de fusión. La traducción del gen de fusión produce un único polipéptido que tiene la propiedad de al menos una, o incluso cada una, de las dos o más proteínas o polipéptidos antes de la fusión. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante técnicas de ADN recombinante para investigación biológica o terapia. Las proteínas de fusión recombinantes se crean mediante ingeniería genética de genes de fusión. La presente invención se refiere a proteínas de fusión recombinantes, y los términos proteínas de fusión y proteínas de fusión recombinantes se utilizan en la presente memoria con el mismo significado. Las proteínas de fusión descritas en la presente memoria generalmente comprenden al menos dos dominios (A y C), y opcionalmente un tercer componente, un enlazador entre los dos dominios. La generación de proteínas de fusión recombinantes es conocida en la técnica y generalmente implica eliminar el codón de paro de la secuencia de ADNc auto codificante de la primera proteína o polipéptido. Posteriormente, la secuencia de ADNc de la segunda proteína se une en marco mediante ligación o PCR de extensión superpuesta. Finalmente, la secuencia de ADN es expresada por la célula como una única proteína. La proteína se puede diseñar para incluir la secuencia completa de dos proteínas o polipéptidos originales, o sólo una fracción de cualquiera de ellos.

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una, uno" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye una pluralidad de portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos.

La "Composición" generalmente es una combinación de dos o más sustancias, por ejemplo, una combinación del agente activo con otros compuestos inertes o activos.

La "composición farmacéutica" generalmente incluye el agente activo en combinación con un portador inerte o activo, de modo que la composición sea adecuada para usos diagnósticos o terapéuticos, ya sea in vivo o in vitro.

En la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" generalmente se refiere a la dosis mínima de ingrediente activo requerida para producir un beneficio terapéutico en un sujeto. Por ejemplo, para un paciente que presenta o es susceptible a diabetes tipo 2, obesidad o síndrome metabólico, o para prevenir la aparición de la enfermedad, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una dosis que es capaz de inducir, mejorar o causar una condición patológica, progresión de la enfermedad o condición fisiológica que está asociada con o contrarrestada por el trastorno descrito anteriormente. En la presente solicitud, el término "sujeto" o "paciente" puede ser un ser humano, pero también puede ser un animal no humano, más específicamente puede ser un animal de compañía tal como un perro, un gato o similar, un animal de granja tal como una vaca, una oveja, un cerdo, caballos o animales de laboratorio tales como ratas, ratones, conejillos de indias y similares.

En la presente invención, una expresión de "XnY" indica que el residuo X en la posición n en una secuencia está sustituido con el residuo Y cuando se describe la sustitución de residuos de aminoácidos en la secuencia. Por ejemplo, la sustitución del aminoácido "R175L" indica que el residuo R en la posición 175 en una secuencia está sustituido por el residuo L.

Proteína de fusión, método de preparación y aplicación

Los inventores de la presente invención descubrieron que las proteínas de fusión de dos dianas conocidas no pueden evitar por completo el problema de la disociación del dímero. La razón puede ser que las interacciones que ocurren en la estructura 3D de las cadenas de 200 aminoácidos aumentan hasta el otro extremo del Fc de la proteína de fusión de diana doble; por lo tanto, se requiere una estructura de la porción Fc de IgG4 más estable para evitar la disociación del dímero.

Sobre la base de una gran cantidad de trabajo inventivo por parte de los inventores, se descubrió sorprendentemente que cuando se introdujeron dos mutaciones (S228P y R409K) en el Fc de IgG4, la estabilidad de la estructura de la porción Fc de IgG4 mejoró enormemente. Además, el Fc mutado tuvo efectos ADCC o CDC menores (o absolutamente nulos) que el Fc comúnmente utilizado. Por lo tanto, la presente invención proporciona una estructura de proteína de fusión con alta estabilidad y bajos efectos ADCC/CDC.

En un aspecto de la invención, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende o consiste en A-L1-B-L2-C o C-L1-B-L2-A,

En el que A es un agonista del receptor GLP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (HGEFTFTSDV SSYLEEQAAK EFAIWLKGG G) o al menos alrededor de 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1, al menos alrededor de 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1, o al menos alrededor de 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1, o al menos alrededor de 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1, o al menos alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1;

B es un mutante de Fc-IgG4, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (ESKYGPPCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRPE VTCVVVDVSDV EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ EGNVDFCSVM HEALTHNYTQ KLSLSLGLG) o al menos alrededor de 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o al menos alrededor de 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 2, o al menos alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, en la que, B comprende el décimo residuo de aminoácido de P (número EU correspondiente a 228) y el residuo de aminoácido 191 de K (número EU correspondiente a 409);

C es FGF21, que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 6 (HPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGLSHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG GSQGRSPSYA S) o al menos alrededor de 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 6, o al menos alrededor de 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 6, o al menos alrededor de 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 6, o un polipéptido que tiene al menos alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 6 y que tiene actividad FGF21; y

L1 y/o L2 son un polipéptido que comprende de 5 a 50 residuos de aminoácidos y el polipéptido comprende al menos 50% de G.

En algunas realizaciones, A comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HX<sub>1</sub>EGTFTSDVSSYLEX<sub>2</sub>QAAK EFAIWLX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>) (SEQ ID NO: 7),

En el que, X<sub>1</sub> se selecciona de G o V;

X<sub>2</sub> se selecciona de E o G;

X<sub>3</sub> se selecciona de V o K;

X<sub>4</sub> se selecciona de K o N;

X<sub>5</sub> se selecciona de G o E; y

5 X<sub>6</sub> se selecciona de G o P o está ausente.

En otras realizaciones, A comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, B comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 8,

ESKYGPPCPP CPAPX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>GGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ  
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFX<sub>10</sub>S TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE  
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL  
VKGFPSPDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ

10 EGNVFSCSVM HEALHNHYTO KSLSLSLGX<sub>11</sub>( SEQ ID NO: 8)

En el que, X<sub>7</sub> se selecciona de P o E;

X<sub>8</sub> se selecciona de F, V o A;

X<sub>9</sub> se selecciona de L, E o A;

X<sub>10</sub> se selecciona de N o A; y

15 X<sub>11</sub> se selecciona de K o está ausente.

En otras realizaciones, B comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, C comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 9,

HPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQTE AHLEIREDTG VGGAX<sub>12</sub>DQSPE  
SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGLHFDP EACSFREX<sub>13</sub>LX<sub>14</sub>  
EDGYNVYQSE AHGLPLHX<sub>15</sub>PG NKSPHRDPAP RGPX<sub>16</sub>RFLPLP GLPPALPEPX<sub>17</sub>  
X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>LAPPPDV GSSDPLX<sub>20</sub>MVX<sub>21</sub> X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>QG X<sub>24</sub>SPSX<sub>25</sub>X<sub>26</sub> S (SEQ ID NO: 9)

20

En el que,

X<sub>12</sub> se selecciona de A, K, R, E o Q;

X<sub>13</sub> se selecciona de L, D, R, E, Q, K o T;

X<sub>14</sub> se selecciona de L o K;

25 X<sub>15</sub> se selecciona de L o C;

X<sub>16</sub> se selecciona de A o C;

X<sub>17</sub> se selecciona de P o A;

X<sub>18</sub> se selecciona de G o A;

X<sub>19</sub> se selecciona de I o V;

X<sub>20</sub> se selecciona de S, H, C o R;

X<sub>21</sub> se selecciona de G, E, A, D o S;

X<sub>22</sub> se selecciona de P, A, E, Q, W, C, G o T;

X<sub>23</sub> se selecciona de S, L, V o M;

5 X<sub>24</sub> se selecciona de R, L, H o P;

X<sub>25</sub> se selecciona de Y, S, A o F; y

X<sub>26</sub> se selecciona de A, S, E o G.

En otras realizaciones, el C comprende, adicionalmente:

a) truncamiento amino terminal de no más de 8 residuos de aminoácidos;

10 b) truncamiento carboxilo terminal de no más de 12 residuos de aminoácidos;

c) truncamiento amino terminal de no más de 8 residuos de aminoácidos y truncamiento carboxilo terminal de no más de 12 residuos de aminoácidos; o

d) extensión carboxilo terminal de no más de 6 residuos de aminoácidos.

15 En algunas realizaciones, L1 y/o L2 comprenden 1, 2 o 3 polipéptidos ricos en G, en algunas realizaciones, L1 y/o L2 se seleccionan de GGGGSGGGGS o GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13) o GGGGSGGGGSGGGGSA.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión es homodimérica.

En otras realizaciones, la proteína de fusión no es homodimérica.

20 La molécula natural de FGF21 contiene un sitio susceptible a la hidrólisis por proteasa; su vida media in vivo es muy corta. Dado que no se ha resuelto la estructura tridimensional de FGF21, los investigadores han realizado varios intentos para reformar su estructura con la expectativa de obtener una vida media más larga. Estos intentos incluyen el truncamiento, elongación, sustitución, inserción o delección de ciertos aminoácidos sobre la base de una secuencia de aminoácidos natural. Algunos investigadores incluso mutan los sitios uno por uno y esperan encontrar el núcleo clave que afecta la actividad y la vida media.

25 La presente invención proporciona una proteína de fusión de diana doble de GLP-1 y FGF21, la cual tiene un sitio de mutación diferente de la proteína de fusión publicada existente. El inventor ha descubierto inesperadamente que la proteína de fusión proporcionada en la presente memoria tiene una vida media más larga y se puede administrar durante más de una semana. Aún más gratificante es que la proteína de fusión puede ejercer un efecto sinérgico, tiene un efecto hipoglucémico notablemente estable y tiene buenas actividades biológicas para reducir los lípidos y el peso corporal.

30 En otro aspecto de la invención, la invención proporciona una proteína de fusión homodimérica que comprende o consiste en:

A-L1-B-L2-C,

35 En el que, A es un agonista del receptor GLP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (HX<sub>1</sub>EGTFTSDV SSYLEX<sub>2</sub>QAAK EFlAWLVKGX<sub>5</sub>G), en el que X<sub>1</sub> se selecciona de G o V; X<sub>2</sub> se selecciona de E o G; y X<sub>5</sub> se selecciona de G o E.

40 B es una variante de Fc-IgG4 que comprende SEQ ID NO: 11 (ESKYGPPCPP CPAPEX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>GGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSLSLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGX<sub>11</sub>), en el que X<sub>8</sub> se selecciona de F, V o A; X<sub>9</sub> se selecciona de L, E o A; X<sub>11</sub> se selecciona de K o está ausente.

45 C es FGF21, que comprende SEQ ID NO: 12 (HPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQTE AHLEIREDGT VGGAVDQSPÉ SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGLHFDP EACSFREX<sub>13</sub>LL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPL X<sub>20</sub>MVG X<sub>22</sub>SQG X<sub>24</sub>SPSX<sub>25</sub>A S)

En el que X<sub>13</sub> se selecciona de L, D, R, E;

X<sub>20</sub> se selecciona de S, H o C;

X<sub>22</sub> se selecciona de A o G;

X<sub>24</sub> se selecciona de R, L o P; y

La mutación del aminoácido en la posición X<sub>25</sub> se selecciona de una cualquiera de los siguientes: Y, S, F.

5 L1 y/o L2 son un polipéptido que comprende de 5 a 50 residuos de aminoácidos y el polipéptido comprende al menos 50% de G.

En algunas realizaciones, A comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, B comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 2.

10 En algunas realizaciones, la proteína de fusión homodimérica comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 5, 17, 18, 19, 20, 21.

15 En otro aspecto de la invención, la invención proporciona polinucleótidos que codifican para las proteínas de fusión de la invención. El polinucleótido que codifica para la proteína anterior puede estar en la forma de ARN o en la forma de ADN, incluyendo ADNc y ADN sintético. El ADN puede ser de cadena doble o de cadena sencilla. La secuencia que codifica para la proteína de la invención puede ser diferente debido a la redundancia o degeneración del código genético. Los polinucleótidos que codifican para proteínas de la invención pueden comprender lo siguiente: solamente secuencias codificantes de proteínas, secuencias codificantes de proteínas y otras secuencias codificantes tales como secuencias líder o secretoras o secuencias de preproteína; secuencias codificantes de proteínas y secuencias no codificantes tales como intrones o secuencias no  
20 codificantes 5' y/o 3' de una secuencia codificante de proteína. Por tanto, el término "polinucleótido que codifica para una proteína" abarca polinucleótidos que pueden incluir no sólo secuencias codificantes de proteínas sino también otras secuencias codificantes y/o secuencias no codificantes.

25 En un aspecto adicional de la invención, también se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. El vector de expresión normalmente se replica en el organismo hospedero como ya sea un cuerpo adicional o como una parte integral del ADN cromosomal del hospedero. En general, los vectores de expresión contienen marcadores de selección tales como tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa para permitir la detección de aquellas células transformadas con la secuencia de ADN deseada.

30 En un aspecto adicional de la invención, también se proporciona una célula hospedera que comprende un vector de acuerdo con la invención. La proteína de diana doble de la presente invención se puede producir fácilmente en células de mamíferos tales como células CHO, NSO, HEK293 o COS, en células bacterianas tales como E. coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescense, o en células fúngicas o de levadura. Las células hospederas (por ejemplo, HEK293) se cultivan utilizando técnicas conocidas en la técnica.

35 En un aspecto adicional de la invención, también se proporciona un método para preparar una proteína de fusión de acuerdo con la invención; el método comprende expresar un vector de acuerdo con la invención en una célula hospedera. El vector que contiene la secuencia de polinucleótidos de interés (por ejemplo, la proteína de fusión de diana doble y la secuencia de control de expresión) se puede transferir a la célula hospedera mediante métodos bien conocidos, y dichos métodos varían dependiendo del tipo de célula hospedera. Por ejemplo, la transformación con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otras células hospederas.

40 En otro aspecto de la presente invención, también se proporciona el uso de la proteína de fusión de la presente invención en la fabricación de una composición farmacéutica, la composición farmacéutica comprende una proteína de fusión de la invención, y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el medicamento se utiliza para el tratamiento de enfermedades metabólicas. En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica es diabetes, tal como diabetes tipo 2. En otras realizaciones,  
45 la enfermedad metabólica es la obesidad. Otras realizaciones incluyen trastornos metabólicos tales como dislipidemia, hipertensión, esteatosis hepática (por ejemplo, hígado graso no alcohólico (NASH)), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis y envejecimiento).

### Ejemplo

50 La divulgación se entiende adicionalmente con los siguientes ejemplos, los cuales son simplemente ejemplos de la divulgación. La presente divulgación no se debe de limitar en alcance por las realizaciones ilustradas, los cuales simplemente pretenden ilustrar un solo aspecto de la presente invención. Cualquier método que sea funcionalmente equivalente está incluido en el alcance de la presente invención. De la descripción anterior y de las figuras, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en la presente memoria serán aparentes para los expertos en la técnica. Estas modificaciones también están dentro del alcance de las  
55 reivindicaciones.

**Ejemplo 1: Construcción del vector**

El portador de la proteína de fusión se construyó utilizando un método de clonación molecular, los mutantes y las secuencias de las proteínas de fusión se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Proteína de fusión	Porción GLP-1	Porción Fc	Porción FGF21	SEQ ID NO:
Dulaglutida	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235A	no	3
S1F1	no	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIP171G	4
D1F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIP171G	5
D1F2	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235A	L98RIP171G	16
D2F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIP171GIY179F	17
D3F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIP171A	18
D4F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIS167HIP171A	19
D5F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIS167HIP171AIR175L	20
D6F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	L98RIG170EIP171AIS172L	21
D7F1	A8GIG22EIR36G	S228PIF234AIL235AIR409K	tipo silvestre	22

5

La secuencia de nucleótidos que codifica para dulaglutida y la proteína de fusión S1F1 fue sintetizada por Kingsbury Biotechnology Co., Ltd. a través de métodos químicos. La secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión D1F1 se obtuvo conectando fragmentos de secuencias de nucleótidos que codifican respectivamente para GLP-1 y Fc-FGF21 mediante la técnica SOE-PCR, las secuencias de nucleótidos que codifican respectivamente para GLP-1 y Fc-FGF21 se obtuvieron mediante PCR mediante el diseño de un cebador y utilizando como plantillas secuencias de nucleótidos de dulaglutida y de la proteína de fusión S1F1.

10

Las secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas de fusión D1F2, D2F1, D3F1, D4F1, D5F1, D6F1 y D7F1 fueron sintetizadas por Suzhou Genewiz Biological Technology Co., Ltd mediante métodos químicos.

15

La secuencia de nucleótidos y el plásmido vector pcDNA3.4 se digirieron con las endonucleasas HindIII y EcoRI (TAKARA, Japón) a 37 °C. Los productos digeridos se recuperaron mediante purificación utilizando el Kit Gel Extraction (OMEGA, America) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gen diana purificado se ligó con el vector utilizando un kit de ligación de ADN Ver.2.1 (TAKARA, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubó a 16 °C durante 1 hora para obtener un plásmido de expresión recombinante.

20

El plásmido recombinante anterior se transformó en células DH5a competentes. Las bacterias se recubrieron en una placa con ampicilina. El monoclonal en la placa se seleccionó y se cultivó en 1 ml de medio LB (10 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de cloruro de sodio y agar al 2%, 100 g/mL de contenido de antibiótico) para extraer el plásmido. Después de la secuenciación y validación, se extrajeron una serie de vectores de expresión correctos validados con el Kit de plásmido de Invitrogen y se digirieron con la enzima de restricción PvuI (TAKARA, Japón). Después de la linealización, el producto se purificó mediante el método de precipitación con etanol y se almacenó a -20 °C para uso futuro.

25

**Ejemplo 2: Transfección del vector que codifica para dulaglutida y expresión en las células**

Después de que las células hospederas CHOK1SV GS-KO (Lonza) se resucitaron con medio CD CHO (gibco), las células se recolectaron y transfectaron a una densidad celular de alrededor de  $8 \times 10^5$  células/mL. Las células fueron transfectadas con alrededor de  $1 \times 10^7$  células y el vector era de alrededor de 40 µg y se transfectaron mediante descarga eléctrica (Bio-Rad, Gene Puls Xcell). Después del choque, las células se cultivaron en 20 mL de medio CD CHO. En el segundo día de cultivo, las células se recolectaron mediante centrifugación a 200 g durante 10 min. Las células se resuspendieron y se cultivaron en 20 mL de medio CD CHO con una concentración final de 50 µM obtenida mediante la adición de MSX (sigma). Cuando la densidad celular era de alrededor de  $0.6 \times 10^6$  células/mL, el clon mixto obtenido se pasó con medio CD CHO y la densidad celular del paso fue de alrededor de  $0.2 \times 10^6$  células/mL. Cuando la viabilidad celular fue de alrededor de 90%, se recolectó el fluido del cultivo celular.

30

35

**Ejemplo 3: Transfección de vectores de proteínas de fusión S1F1 y D1F1, D1F2, D2F1, D3F1, D4F1, D5F1, D6F1, D7F1 y expresión en las células**

Después de que las células hospederas HEK293F (Invitrogen, Freestyle 293F) se resucitaron con medio de expresión 293 (Invitrogen), se recolectaron y se transfectaron a una densidad celular de alrededor de  $1 \times 10^6$  células/mL. Las células fueron transfectadas con el Kit de transfección de reactivos MAX de FreeStyle™. Había alrededor de  $3 \times 10^7$  células y el vector era de alrededor de 37.5 µg. Después de la transfección, las células se cultivaron en 30 mL de medio de expresión 293. En el segundo día de cultivo, los transformantes genéticos comenzaron a cribarse con geneticina (merck). Según fue necesario debido al crecimiento celular, el medio se reemplazó cada 3 a 5 días para el cribado. Después de alrededor de 14 días de selección, aparecieron clones resistentes y se pudieron expandir. La densidad de paso celular fue de alrededor de  $0.5 \times 10^6$  células/mL. El clon mixto obtenido se subcultiva con medio de expresión 293. Cuando la viabilidad celular fue de alrededor de 90%, se recolectó el fluido del cultivo celular.

**Ejemplo 4: Purificación de proteína a partir del caldo de fermentación de células recolectadas**

Se detectó el nivel de traducción de las ocho proteínas de fusión descritas en los Ejemplos 2 y 3. El medio de cultivo celular recolectado se purificó mediante cromatografía de proteína A (EzFast Protein A Diamond, Bestchrom). La solución de equilibrio fue 20 mM de PBS, 0.15 M de NaCl, pH 7.4. La proteína de fusión dulaglutida y S1F1 se eluyeron con un amortiguador de 0.1 M de ácido cítrico, pH  $3.2 \pm 0.2$ . Las proteínas de fusión D1F1, D1F2, D2F1, D3F1, D4F1, D5F1, D6F1 y D7F1 se eluyeron con 0.1 M de glicina, pH  $3.2 \pm 0.2$ . El eluato diana se recolectó en el pico de absorción diana y se dializó con amortiguador PBS para tomar parte de la muestra para espectrometría de masas. El peso molecular detectado por espectrometría de masas fue consistente con el peso molecular teórico y estaban en forma homodimérica. Se confirmó que la proteína de fusión era la proteína de fusión diana. Al mismo tiempo, las muestras recolectadas fueron detectadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% después de la reducción y no reducción. La electroforesis mostró una única banda con un tamaño de banda consistente con la teoría.

**Ejemplo 5: Detección de AMPc producido por estimulación con proteína de fusión en el modelo celular HEK293/GLP-1R/KLB**

Las células HEK293 produjeron AMPc con la expresión de GLP-1R/KLBGLP-1 estimulada por la proteína de fusión de prueba. Se utilizó el kit de ensayo de AMPc (Cisbio 62AM6PEC) para medir la concentración de la proteína de fusión y la cantidad de AMPc producida por estimulación para establecer una curva dosis-respuesta que mida la actividad de los compuestos de prueba in vitro. Se probaron dos proteínas de fusión, incluyendo los grupos de dulaglutida y proteína de fusión D3F1. Los resultados de la prueba de AMPc se muestran en la Figura 2 y la Tabla 2.

Tabla 2

La proteína de prueba	Dulaglutida	D3F1
EC50	0.2683	0.01984
Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 18

**Ejemplo 6: Investigación sobre el efecto de la mutación de Fc409 de R a K en la estabilidad de la proteína de fusión mediante calorimetría diferencial de barrido microcalorimétrico (DSC)**

Las proteínas de fusión D1F1, D1F2, D6F1 y D7F1 obtenidas en el Ejemplo 4 se diluyeron cada una a 1 mg/ml con un sistema de amortiguador en blanco (20 mM de PBS pH 7.4), tomando 500 µL para el análisis de DSC (Microcal vp-Capillary DSC). La temperatura de escaneo fue de 20 °C a 100 °C y la tasa de calentamiento fue de 1 °C/min. Los resultados de la calorimetría de barrido microcalorimétrico se muestran en la Figura 3, y los valores de  $T_m$  obtenidos después del ajuste con Origin™ se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Proteína de prueba	Concentración de proteína (nM)	DH (entalpía)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
D7F1	Alrededor de 9.7	3.56E+08	65.43	80.74
D6F1		3.28E+08	64.73	80.7
D1F1		3.12E+08	64.93	80.58
D1F2		2.85E+08	65.71	N/A

Cuanto mayor sea la temperatura  $T_m$  de transición de fase, más fuerte será la estabilidad molecular. De los resultados anteriores se observa que los valores de  $T_{m1}$  y  $T_{m2}$  de las muestras D7F1, D6F1 y D1F1 son básicamente los mismos, lo que indica que la estabilidad de las tres proteínas es más consistente. El valor de  $T_{m1}$  de D1F2 es básicamente el mismo que el de las otras tres muestras, pero su  $T_{m2}$  es significativamente menor que los valores de  $T_{m2}$  para otras muestras. Del análisis estructural de las proteínas D1F1 y D1F2, se puede concluir que la principal diferencia es que la R en el aminoácido 409 en el dominio CH3 de Fc de IgG4 está mutada a K, y esta mutación resultó en una  $T_{m2}$  significativamente mayor para D1F1 que el valor de  $T_{m2}$  para D1F2. Los resultados mostraron que la mutación de R a K en la posición 409 en el dominio CH3 de Fc de IgG4 en D1F1 aumentó el valor de  $T_m$  del dominio y por lo tanto mejoró su estabilidad proteica.

**Ejemplo 7: Un estudio sobre el efecto de la mutación Fc409 de R a K en el efecto hipoglucémico de la proteína de fusión**

Se estudió la eficacia de la proteína de fusión en el modelo de ratón db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University). Los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos, incluyendo el grupo en blanco, el grupo D1F1 y el grupo D1F2. A cada ratón db/db se le inyectó con 24.5 nM/kg de la proteína de fusión; el volumen de administración fue de 10 ml/kg. Se utilizaron siete ratones por proteína de fusión y se les administró una inyección, y se midió el nivel de glucosa en sangre en diferentes momentos. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Como resultado, el 409 del Fc de IgG4 fue mutado a K, el efecto hipoglucémico podría mantenerse por más tiempo.

Tabla 4

Grupo	concentración de glucosa en sangre (mmol/L)			
	Día 0	Día 2	Día 5	Día 8
Grupo en blanco	24.0 ± 5.1	21.0 ± 6.5	23.8 ± 6.1	19.8 ± 5.4
D1F1	24.0 ± 5.2	8.7 ± 2.5	15.2 ± 4.5	16.5 ± 5.2
D1F2	24.5 ± 4.3	8.4 ± 2.5	17.3 ± 5.5	19.5 ± 3.7

**Ejemplo 8: Un estudio sobre el efecto hipoglucémico de dulaglutida, S1F1, D1F1 en el modelo de ratón db/db**

Se estudió la eficacia de las proteínas de fusión en el modelo de ratón db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University). Una serie de proteínas de fusión purificadas se diluyeron con 10 mM de PBS durante el experimento. Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, incluyendo el grupo en blanco, el grupo dulaglutida, el grupo S1F1 y el grupo D1F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 40 nM/kg de la proteína de fusión, el volumen de administración fue de 3 ml/kg y se inyectaron 10 ratones por proteína de fusión una vez por semana durante dos semanas. Los resultados de los cambios en el muestreo de glucosa en sangre después de la administración se muestran en la Figura 4. El grupo D1F1 tuvo una ventaja hipoglucémica significativa y su curva hipoglucémica fue más estable que la de los grupos dulaglutida y S1F1.

**Ejemplo 9: Un estudio sobre el efecto hipoglucémico de D1F1, D2F1, D7F1 en el modelo de ratón db/db**

Se estudió la eficacia de la proteína de fusión en el modelo de ratón db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University). Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo D1F1, el grupo D2F1 y el grupo D7F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 24.5 nM/kg de proteína de fusión (diluida con 10 mM de PBS), el volumen de administración fue de 10 ml/kg. Se inyectaron siete ratones por proteína de fusión una vez y se midió el nivel de glucosa en sangre en diferentes momentos. Los resultados se muestran en la Figura 5. Ellos demostraron que D1F1 y D2F1 tenían mejores efectos hipoglucémicos que D7F1.

**Ejemplo 10: Un estudio sobre el efecto hipoglucémico de D3F1, D4F1, D5F1 en el modelo de ratón db/db**

Se estudió la eficacia de las proteínas de fusión en el modelo de ratón db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University). Una serie de proteínas de fusión purificadas se diluyeron con 10 mM de PBS durante el experimento. Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo D3F1, el grupo D4F1 y el grupo D5F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 30 nM/kg de la proteína de fusión (diluida con 10 mM de PBS), el volumen de administración fue de 10 ml/kg y se inyectaron 9 ratones por proteína de fusión una vez por semana durante dos semanas. Los resultados de los cambios en el muestreo de glucosa en sangre después de la administración se muestran en la Figura 6. D3F1, D4F1 y D5F1 mostraron mejores efectos hipoglucémicos.

**Ejemplo 11: Estudio sobre el efecto de eficacia de dulaglutida, S1F1, D1F1 en la reducción de lípidos en el modelo de ratón db/db**

Los ratones modelo db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo dulaglutida, el grupo S1F1 y el grupo D1F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 40 nM/kg de proteína de fusión (diluida con 10 mM de PBS), el volumen de administración fue de 3 ml/kg y se inyectaron 10 ratones por proteína de fusión una vez por semana durante dos semanas. Todos los ratones fueron sacrificados 14 días después de la administración inicial y se midió su contenido de colesterol total en sangre (TCHO) (véase la Figura 7) y triglicéridos (TG) (véase la Figura 8). La capacidad de D1F1 para reducir el contenido total de colesterol y triglicéridos fue mayor que la del grupo S1F1 y la del grupo dulaglutida.

**Figura 12: Un estudio sobre la eficacia de D1F2, D2F1 y D7F1 para reducir los lípidos en el modelo de ratón db/db**

Los ratones modelo db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo D1F2, el grupo D2F1 y el grupo D7F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 24.5 nM/kg de la proteína de fusión (diluida con 10 mM de PBS), el volumen de administración fue de 10 ml/kg. Se inyectaron siete ratones por proteína de fusión una vez. Los resultados de una prueba de triglicéridos (TG) séricos después de una única administración durante 14 días se muestran en la Figura 9; los resultados del contenido de colesterol total (TC) se muestran en la Figura 1; los resultados del contenido de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) se muestran en la Figura 1, y los resultados del contenido de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) se muestran en la Figura 12. Los grupos D1F2 y D2F1 mostraron una mayor capacidad para reducir los triglicéridos que D7F1 con una secuencia FGF21 nativa. D2F1 mostró una mayor capacidad para reducir los triglicéridos y el colesterol total que D1F2, el cual no mutó en la posición 409 de Fc de IgG4.

**Ejemplo 13: Un estudio de la eficacia de D3F1, D4F1 y D5F1 para reducir los lípidos en el modelo de ratón db/db**

Los ratones modelo db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo D3F1, el grupo D4F1 y el grupo D5F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 30 nM/kg de la proteína de fusión (diluida con 10 mM de PBS), el volumen de administración fue de 3 ml/kg y se inyectaron 9 ratones por proteína de fusión una vez por semana durante dos semanas. Los resultados de triglicéridos (TG) séricos después de 14 días de la primera administración se muestran en la Figura 13. Los resultados del colesterol total (TCHO) se muestran en la Figura 14. Los resultados de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) se muestran en la Figura 15.

**Ejemplo 14: Un estudio sobre la eficacia de dulaglutida, S1F1, D1F1 para la pérdida de peso en el modelo de ratón db/db**

Los ratones modelo db/db (Institute of Model Animal Science, Nanjing University) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo dulaglutida, el grupo S1F1 y el grupo D1F1. A cada ratón db/db se le inyectó con 40 nM/kg de la proteína de fusión (diluida con 10 mM de PBS), el volumen de administración fue de 3 ml/kg y se inyectaron 10 ratones por proteína de fusión una vez por semana durante dos semanas. El peso corporal se registró diariamente después de la administración y los resultados se muestran en la Figura 16.

**Ejemplo 15: Estudio sobre la farmacocinética de dulaglutida, D1F1**

Los ratones ICR machos (Hunan Si Lake) se dividieron en 2 grupos, cada grupo con 3 ratones, y a cada uno se le inyectó por vía subcutánea con 10 nmol/kg de dulaglutida o 10 nmol/kg de D1F1 (diluida con 10 mM de PBS). La sangre venosa se recolectó a través del plexo venoso retroorbitario 1, 5, 7, 24, 48, 96, 144, 192, 240 y 288 h antes de la administración y después de la administración, respectivamente. El anticuerpo anti GLP-1 (Bioporto, CAT.NO. ABS 033-10) se utilizó como anticuerpo de captura, el anticuerpo Fc de IgG anti humano (Southern Biotech, CAT.NO. 9200-05) se utilizó como el anticuerpo de detección, los parámetros farmacocinéticos se determinaron mediante el método de ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Sustancia de prueba	T <sub>máx</sub> (h)	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	AUC <sub>último</sub> (h*µg/ml)	MRT <sub>último</sub> (h)
D1F1	6.33	3.77	149.6	32.47
Dulaglutida	5.67	1.72	46.9	37.56

50

La exposición plasmática promedio ( $AUC_{\text{último}}$ ) y la  $C_{\text{máx}}$  de la proteína de fusión D1F1 fueron significativamente más altas que las de dulaglutida, lo que indica que la absorción de la proteína de fusión se puede aumentar después de la fusión con FGF21.  $MRT_{\text{último}}$  indica los tiempos promedio de retención de las moléculas del fármaco en el cuerpo, los cuales fueron equivalentes tanto para D1F1 como para dulaglutida en ratones.

5

**Ejemplo 16: Un estudio de la farmacocinética de dulaglutida, D5F1 en el modelo de ratón ob/ob**

Los ratones ob/ob (Institute of Model Animal Science, Nanjing University) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, incluyendo el grupo en blanco (10 mM de PBS), el grupo 10 nmol/kg de DSF1, el grupo 20 nmol/kg de D5F1 y el grupo 20 nmol/kg de dulaglutida (diluida con 10 mM de PBS). El volumen de administración fue de 3 ml/kg y se inyectaron 9 ratones por proteína de fusión, dos veces por semana durante 3 semanas consecutivas. Los resultados de las pruebas de glucosa en sangre antes de cada administración se muestran en la Figura 17. En comparación con dulaglutida, D5F1 mostró un mejor efecto hipoglucémico y la curva hipoglucémica del grupo D5F1 fue más estable. Se extrajo sangre de la órbita del segundo día después de la última administración durante 16 horas, posteriormente se recolectó el suero. Se monitoreó la glucosa sérica (los resultados se muestran en la Figura 18). Luego del seccionado, se pesó el hígado (los resultados se muestran en la Figura 19). De acuerdo con los resultados del peso hepático, el grupo D5F1 tiene una mejoría mayor en la esteatosis hepática.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende o consiste en un primer polipéptido: péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) o un análogo del mismo, un segundo polipéptido: una porción Fc de IgG4 de humano y un tercer polipéptido: factor de crecimiento de fibroblasto 21 (FGF21) o una variante del mismo, en el que el primer polipéptido está unido al segundo polipéptido a través de un primer enlazador y el tercer polipéptido está unido al segundo polipéptido a través de un segundo enlazador; y en el que la porción Fc de IgG4 de humano comprende una cualquiera de las siguientes combinaciones de mutaciones:
- 5 1) S228P y R409K;
- 2) S228P, E233P y R409K;
- 10 3) S228P, N297A y R409K;
- 4) S228P, F234A, L235A y R409K;
- 5) S228P, F234V, L235E y R409K; y
- 6) S228P, F234A, L235A, R409K y K447, en comparación con el Fc de IgG4 de humano de tipo silvestre (sistema de numeración EU);
- 15 el análogo de GLP-1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HX<sub>1</sub>EGTFTSDVSSYLEX<sub>2</sub>QAAKEFIAWLX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>),
- en el que X<sub>1</sub> se selecciona de G o V;
- X<sub>2</sub> se selecciona de E o G;
- X<sub>3</sub> se selecciona de V o K;
- 20 X<sub>4</sub> se selecciona de K o N;
- X<sub>5</sub> se selecciona de G o E; y
- X<sub>6</sub> se selecciona de G, P o está ausente; y
- en el que el FGF21 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- en el que en comparación con SEQ ID NO: 15, la variante de FGF21 comprende mutaciones de aminoácidos
- 25 en uno o más sitios de 98 o 171; en el que la mutación de aminoácidos en la posición 98 se selecciona del grupo que consiste en L98D y L98R; y en el que la mutación de aminoácidos en la posición 171 se selecciona del grupo que consiste en P171A y P171G; y
- en el que en comparación con SEQ ID NO: 15, la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 167, 175 y 179; en el que la mutación
- 30 del aminoácido en la posición 167 se selecciona del grupo que consiste en S167H y S167C; en el que la mutación del aminoácido en la posición 175 se selecciona del grupo que consiste en R175L, R175H y R175P; y en el que la mutación del aminoácido en la posición 179 se selecciona del grupo que consiste en Y 179S e Y179F.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la porción Fc de IgG4 comprende o consiste en una
- 35 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el análogo de GLP-1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la variante de FGF21 comprende o consiste en una
- 40 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y comprende al menos una mutación de aminoácido en la posición 170 o 172, en la que
- la mutación del aminoácido en la posición 170 se selecciona del grupo que consiste en G170E, G170A, G170D y G170S;
- la mutación del aminoácido en la posición 172 se selecciona del grupo que consiste en S172L, S172V y S172M.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 4, en la que la variante de FGF21 comprende adicionalmente una
- 45 o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 45, 100, 150, 151, 152 y 180; en la que

## ES 3 014 984 T3

- la mutación del aminoácido en la posición 45 se selecciona del grupo que consiste en A45K, A45R, A45E y A45Q;
- la mutación del aminoácido en la posición 100 es L100K;
- la mutación del aminoácido en la posición 150 es P150A;
- 5 la mutación del aminoácido en la posición 151 es G151A;
- la mutación del aminoácido en la posición 152 es I152V;
- y
- la mutación del aminoácido en la posición 180 se selecciona del grupo que consiste en A180S, A180E y A180G.
- 10 6. La proteína de fusión de la reivindicación 4, en la que la variante de FGF21 comprende adicionalmente una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 45 y 180; en la que
- la mutación del aminoácido en la posición 45 se selecciona del grupo que consiste en A45K, A45R, A45E y A45Q; y
- la mutación del aminoácido en la posición 180 se selecciona del grupo que consiste en A180S, A 180E y A180G.
- 15 7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la variante de FGF21 también comprende una o más mutaciones en uno o más sitios seleccionados del grupo que consiste en 98, 167, 175 y 179; en la que
- la mutación del aminoácido en la posición 98 es L98R;
- la mutación del aminoácido en la posición 167 es S167H;
- la mutación del aminoácido en la posición 175 es R175L; y
- la mutación del aminoácido en la posición 179 es Y179F.
- 20 8. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el primer enlazador y el segundo enlazador comprenden cada uno independientemente un polipéptido de 5 a 50 residuos de aminoácidos, y el polipéptido comprende al menos 50% de G, o
- en el que el primer enlazador y/o el segundo enlazador comprenden cada uno independientemente 1, 2 o 3 polipéptidos ricos en G, o
- 25 en el que el primer enlazador y el segundo enlazador se seleccionan cada uno independientemente de GGGGSGGGGS, GGGGSGGGSGGGGS o GGGGSGGGSGGGGSA.
9. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la proteína de fusión es una proteína de fusión homodimérica o una proteína de fusión no homodimérica.
10. Un polinucleótido que codifica para la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
12. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de enfermedades metabólicas, en el que la enfermedad metabólica se selecciona de diabetes, obesidad y esteatosis hepática.

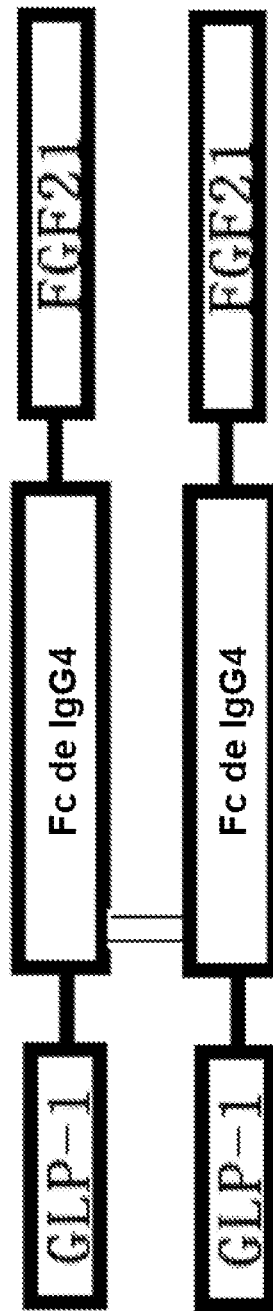


Figura 1

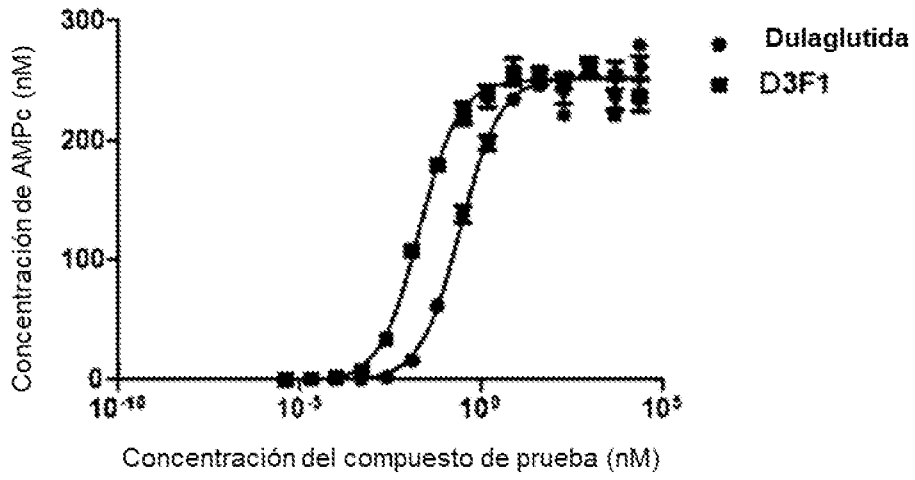


Figura 2

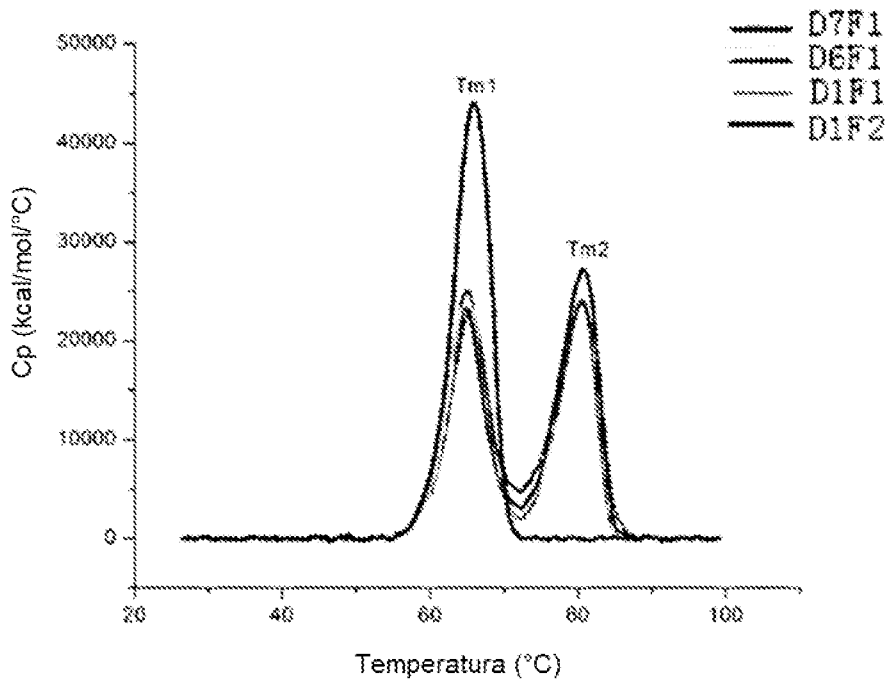


Figura 3

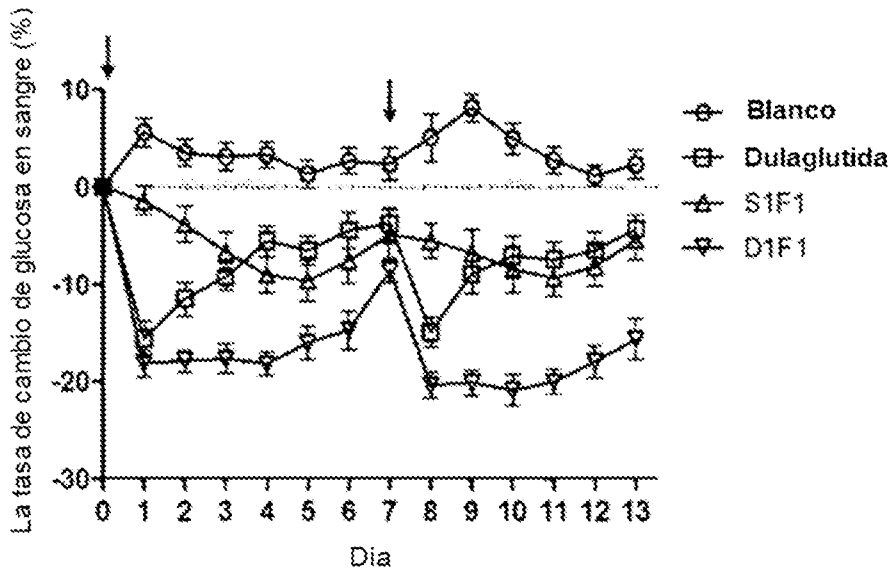


Figura 4

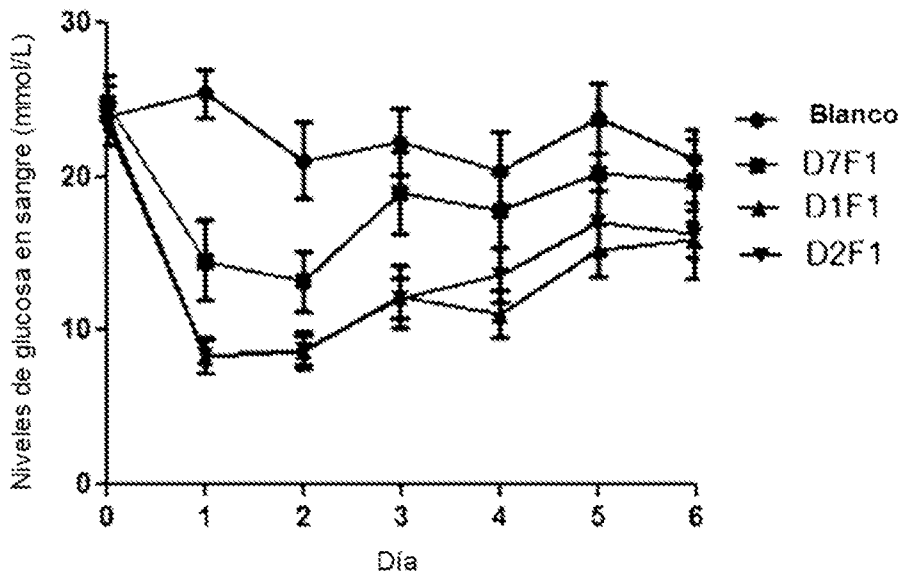


Figura 5

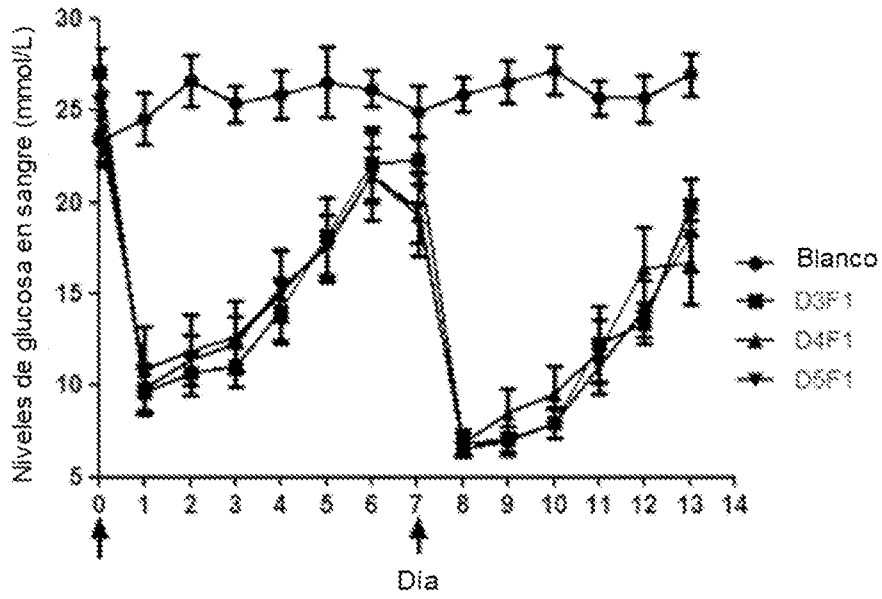


Figura 6

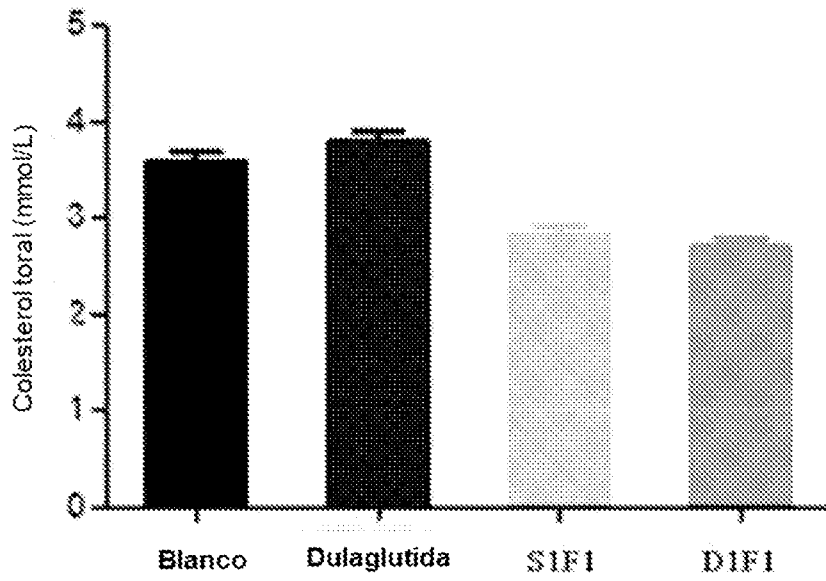


Figura 7

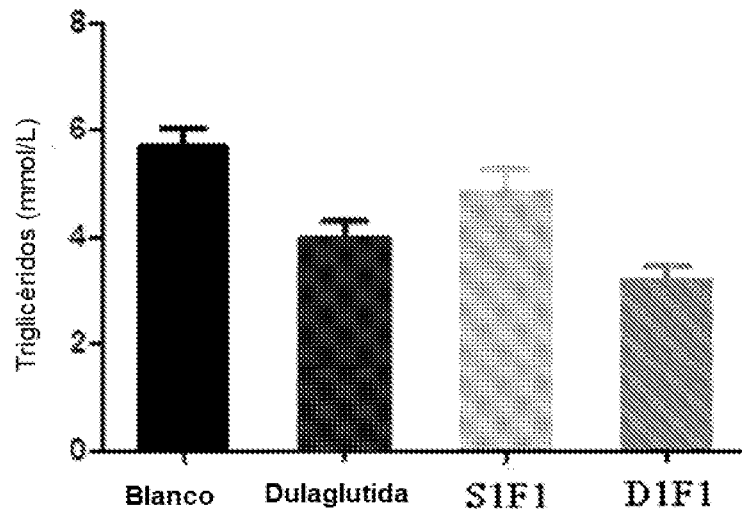


Figura 8

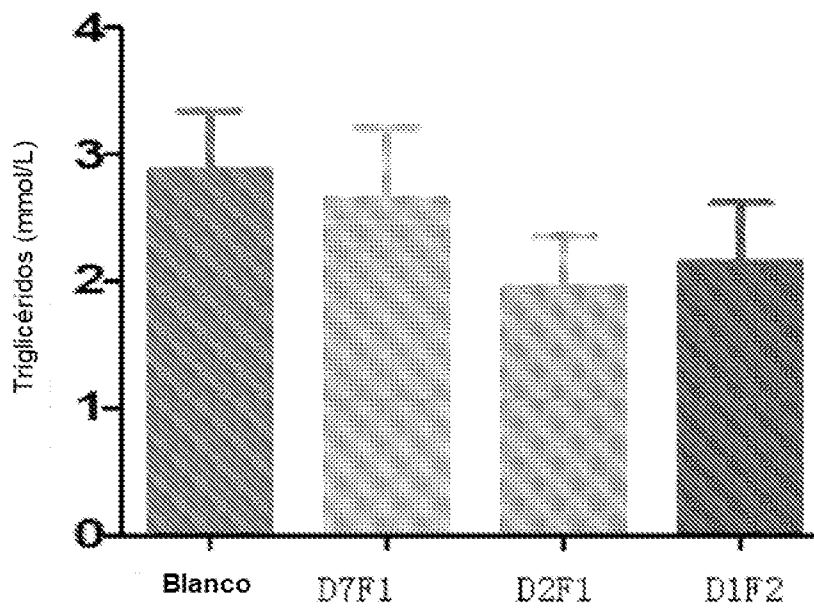


Figura 9

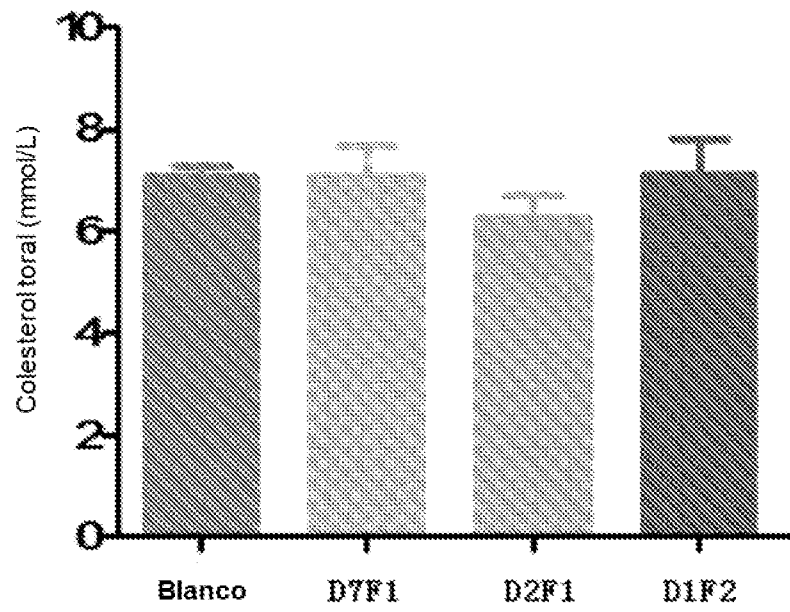


Figura 10

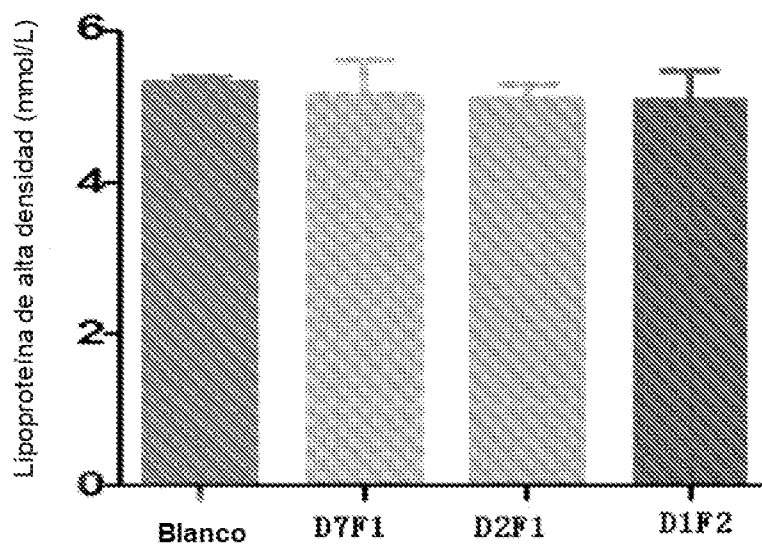


Figura 11

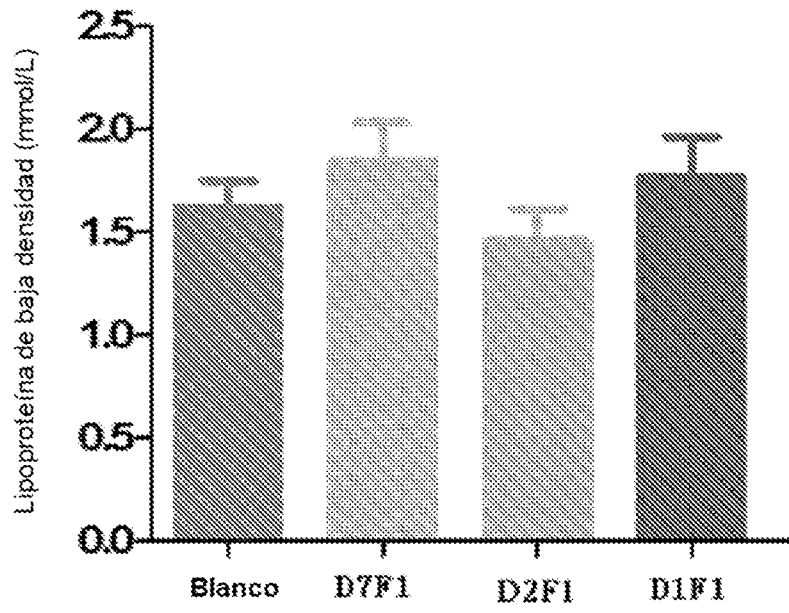


Figura 12

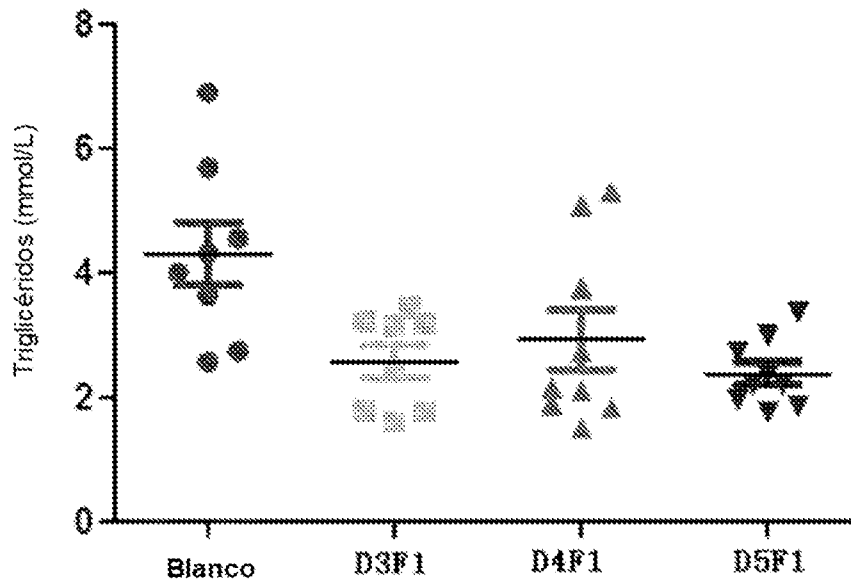


Figura 13

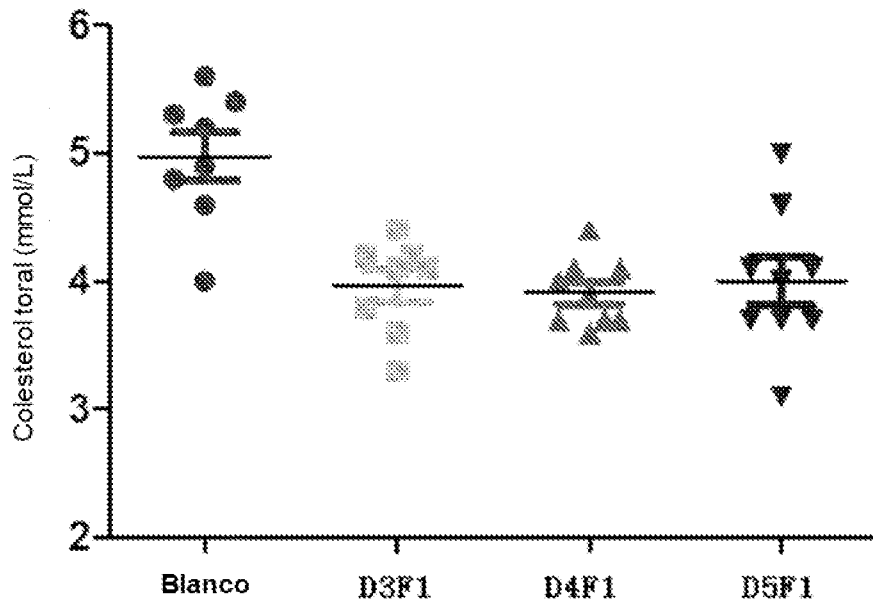


Figura 14

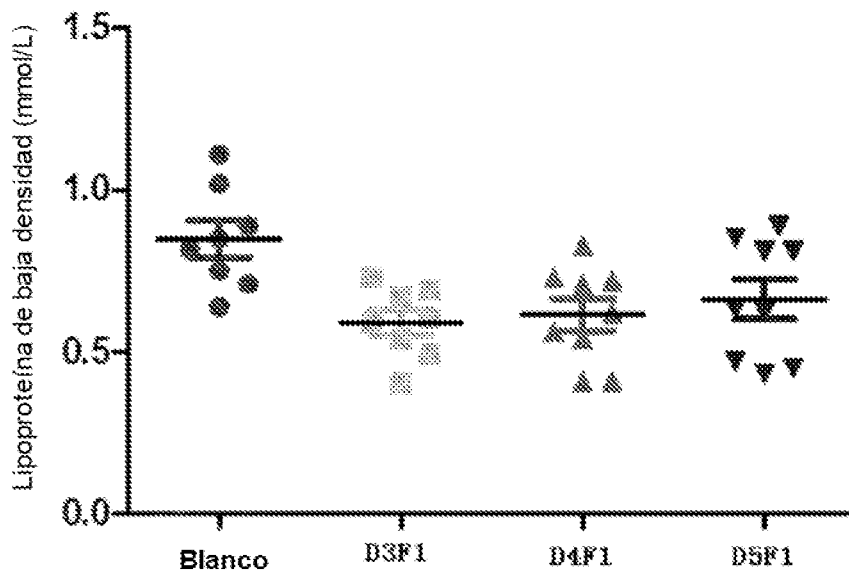


Figura 15

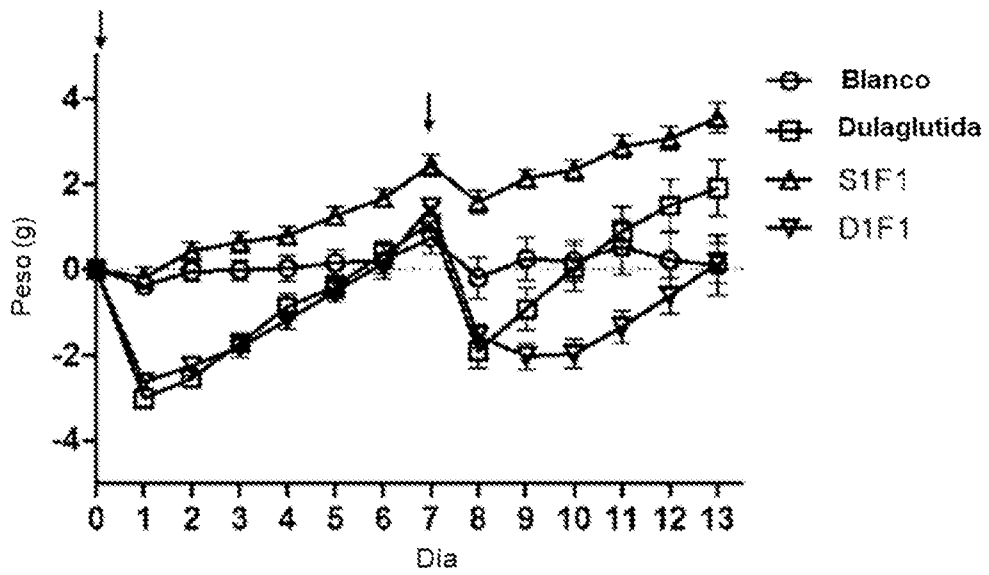


Figura 16

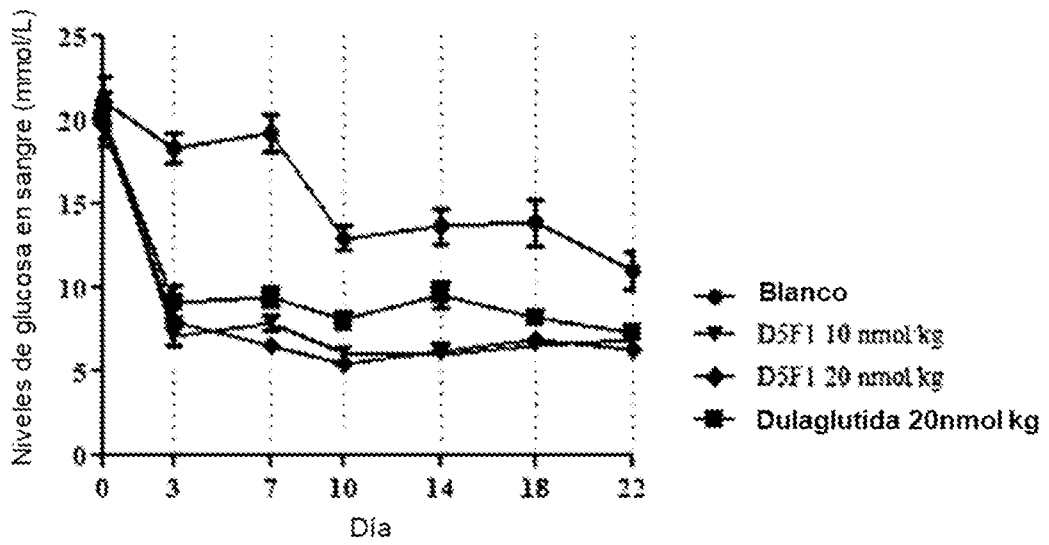


Figura 17

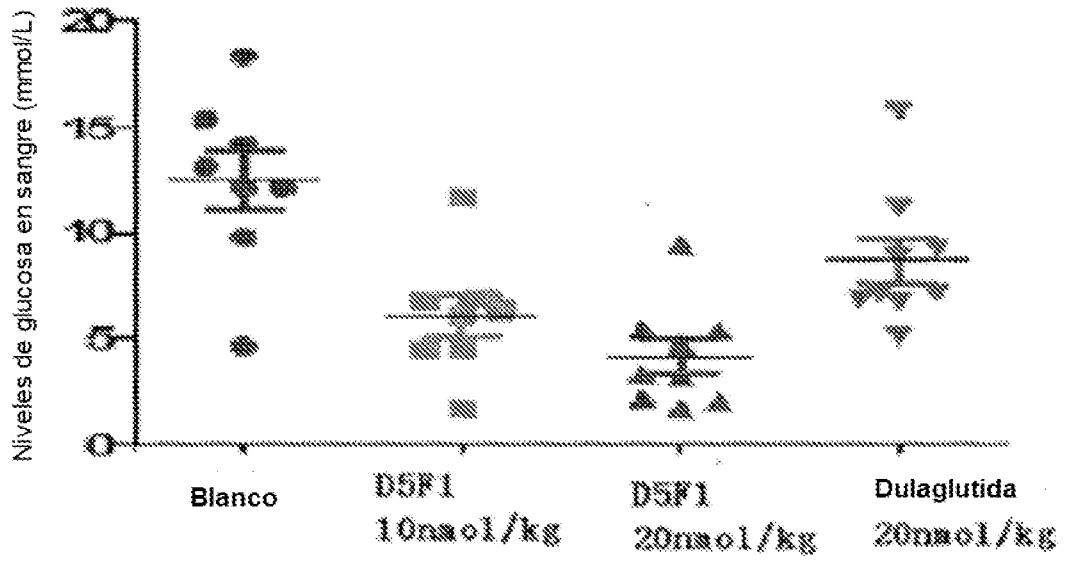


Figura 18

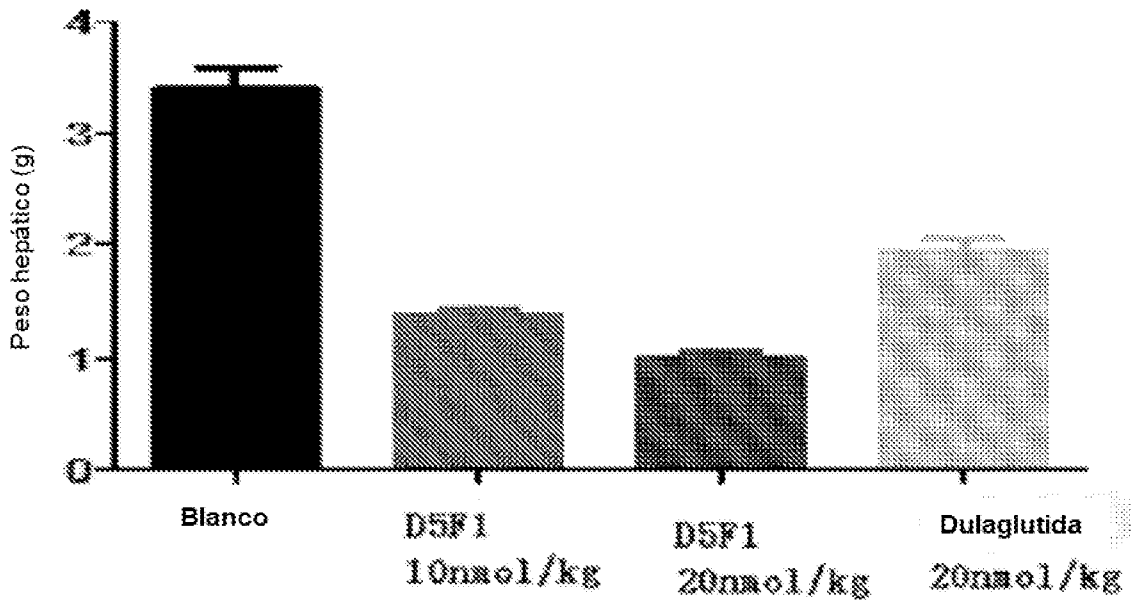


Figura 19