

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 110**

51 Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2016 PCT/KR2016/012300**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17074123**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016 E 16860306 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025 EP 3368555**

54 Título: **Proteínas de doble función y composición farmacéutica que comprende las mismas**

30 Prioridad:

28.10.2015 KR 20150150576

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2025

73 Titular/es:

**YUHAN CORPORATION (100.00%)
74 Noryangjin-ro, Dongjak-gu
Seoul 06927, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, JUN HWAN;
LIM, SEYOUNG;
SEO, MINJI;
CHOI, HYUN HO;
KIM, DOHOON;
JU, MI KYEONG;
PARK, JU-YOUNG;
KIM, SEUL GI;
LIM, SANGMYOUN;
KIM, JONG GYUN y
NAM, SU YOUN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 013 110 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 doble función y composición farmacéutica que comprende las mismas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una proteína de doble función que incluye una proteína biológicamente activa y una proteína mutante de factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), y a una composición farmacéutica que contiene la misma.

Antecedentes de la técnica

El documento US 2013/0129724 A1 se refiere a proteínas de doble función para el tratamiento de trastornos metabólicos.

10 El péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) es una hormona incretina que consiste en 31 aminoácidos, que secretan células L en el tracto intestinal cuando se estimulan por alimentos, etc. Sus efectos biológicos surgen por medio de señalización intracelular a través del receptor de GLP-1, un receptor acoplado a proteína G que se expresa en tejidos diana como las células β en el páncreas, el cerebro, etc. El GLP-1 secretado en la sangre tiene una semivida muy corta de menos de 2 minutos, que está provocada por una pérdida de actividad debido a la escisión de los aminoácidos

15 en el extremo N-terminal por la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). Dado que GLP-1 estimula la secreción de insulina en células β en el páncreas basándose en el nivel de glucosa en sangre, tiene un fuerte efecto sobre la reducción de la glucosa en sangre sin inducir hipoglucemia. Además, la administración de GLP-1 da como resultado la pérdida de peso corporal en varios modelos animales y seres humanos, lo que se sabe que está provocado por una ingesta reducida de alimentos debido a su efecto sobre la supresión del apetito. GLP-1 induce la proliferación de

20 células β y mejora la viabilidad de células β al inhibir la muerte celular provocada por la toxicidad de los glucolípidos a través del receptor de GLP-1 expresado en células β del páncreas. La secreción excesiva de glucagón aumenta la glucosa en sangre, que se sabe que es una de las causas de la hiperglucemia en los diabéticos. Además, se sabe que GLP-1 actúa sobre las células α del páncreas inhibiendo la elevación de la glucosa en sangre en ayunas al inhibir la secreción de glucagón específico de proteína quinasa A (PKA).

25 La exendina-4 es un agonista del receptor de GLP-1 de importancia clínica. La exendina-4 es un polipéptido con 39 residuos de aminoácidos y normalmente se produce en las glándulas salivales del lagarto monstruo de Gila. Se sabe que la exendina-4 tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 52 % con GLP-1 e interactúa con el receptor de GLP-1 en mamíferos (Thorens *et al.* (1993) Diabetes 42:1678-1682). Se ha demostrado que la exendina-4 estimula la secreción de insulina por las células productoras de insulina, *in vitro*, y la inducción de la liberación de insulina por

30 células productoras de insulina es más fuerte que la del GLP-1 en condiciones equimolares. Si bien la exendina-4 estimula fuertemente la secreción de insulina para disminuir los niveles de glucosa en sangre tanto en roedores como en seres humanos con una duración de la acción más prolongada que la del GLP-1, la exendina-4 presenta antigenicidad en mamíferos desprovistos de GLP-1 ya que tiene epítomos desconocidos en tales animales.

35 La capacidad de los análogos de GLP-1 y exendina-4 (p. ej., liraglutida y byetta) para mejorar el control de la glucosa en seres humanos se ha confirmado clínicamente. Se ha notificado que GLP-1 aumenta la masa de células β a través de la inhibición de la apoptosis y la proliferación inducida. Además, también se ha notificado que GLP-1 actúa como una hormona intestinal que inhibe la secreción de ácido gástrico y el vaciamiento gástrico al tiempo que mejora las señales de saciedad, reduciendo así el apetito. Tales efectos de GLP-1 pueden explicar la pérdida de peso observada cuando se administran análogos de GLP-1 a pacientes con diabetes tipo 2. Además, GLP-1 presenta efectos

40 cardioprotectores después de la isquemia en roedores.

Se han realizado varios intentos para desarrollar análogos de GLP-1 de acción prolongada. Los análogos de GLP-1 de acción prolongada clínicamente confirmados incluyen dulaglutida (documento WO 2005/000892) y albiglutida (documento WO 2003/059934). La dulaglutida es un análogo de GLP-1 fusionado a Fc y la albiglutida es un análogo de GLP-1 fusionado a albúmina, ambos de los cuales tienen perfiles farmacocinéticos que permiten su administración una vez por semana. Ambos fármacos tienen excelentes efectos sobre la reducción de la glucosa en sangre y del peso corporal con administración una vez por semana, y también proporcionan una comodidad mucho mayor en cuanto al tratamiento en comparación con byetta y liraglutida.

45 Mientras tanto, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), sintetizado en el hígado, es una hormona conocida por desempeñar un papel importante en la homeostasis de la glucosa y los lípidos. FGF21 presenta acciones farmacológicas en el hígado, los adipocitos, las células β del páncreas, el hipotálamo en el cerebro y los tejidos musculares, donde se expresan tanto un receptor específico de FGF21, es decir, el receptor de FGF, como el complejo β -klotho. Se ha notificado que, en modelos murinos y de primates no humanos de diversas enfermedades diabéticas y metabólicas, FGF21 puede reducir los niveles de glucosa en sangre de manera independiente de la insulina, reducir el peso corporal y disminuir las concentraciones de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre.

55 Además, debido a su efecto de mejora de la sensibilidad a la insulina, FGF21 tiene potencial para el desarrollo como un nuevo agente terapéutico para la diabetes y la obesidad (véase el documento WO2003/011213).

En consecuencia, con el fin de desarrollar un nuevo fármaco antidiabético basado en FGF21, se han realizado intentos

para mejorar su actividad biológica y estabilidad *in vivo* mediante la construcción de mutantes de FGF21 basados en la secuencia de FGF21 de tipo silvestre por medio de sustitución, inserción y eliminación de algunos aminoácidos (véase el documento WO2010/065439). Sin embargo, puesto que FGF21 tiene una semivida muy corta, ha resultado problemático si se usa directamente como agente bioterapéutico (Kharitonov, A. *et al.* (2005) Journal of Clinical Investigation 115:1627-1635). La semivida *in vivo* de FGF21 es de 1 a 2 horas en ratones y de 2,5 a 3 horas en monos. Por lo tanto, para que FGF21 se use en su forma actual como agente terapéutico para la diabetes, se requiere una administración diaria.

Se han notificado diversos enfoques para intentar aumentar la semivida *in vivo* de las proteínas recombinantes FGF21. Un ejemplo de ello es unir polietilenglicol (PEG), es decir, un material polimérico, a FGF21 para aumentar su peso molecular, inhibiendo así la excreción renal y aumentando el tiempo de retención *in vivo* (véase el documento WO2012/066075). Otro enfoque intenta mejorar la semivida fusionándola con un ácido graso, que se une a la albúmina humana (véase el documento WO2012/010553). Un ejemplo adicional intenta aumentar la semivida mientras se mantiene una actividad farmacológica equivalente a la de FGF21 de tipo silvestre a través de la generación de un anticuerpo agonista, que se une específicamente al receptor de FGF humano solo o como un complejo con β -klotho. (véase el documento WO2012/170438). En otro ejemplo, se mejoró la semivida preparando proteínas de fusión de acción prolongada, en las que una región Fc de IgG se une a una molécula de FGF21 (véase el documento WO2013/188181).

Entre las diversas tecnologías disponibles para crear fármacos de acción prolongada, la tecnología de fusión de Fc se usa ampliamente porque tiene menos desventajas que las observadas con otros enfoques, como inducir una respuesta inmunitaria o toxicidad mientras aumenta la semivida *in vivo*. Para el desarrollo de una proteína FGF21 fusionada a Fc como fármaco terapéutico de acción prolongada, deben cumplirse las siguientes condiciones.

En primer lugar, la disminución de la actividad *in vitro* provocada por la fusión debe minimizarse. Tanto el extremo N-terminal como el extremo C-terminal de FGF21 están involucrados en la actividad de FGF21. A este respecto, se sabe que las actividades de las proteínas de fusión de FGF21 varían en gran medida dependiendo de la ubicación de la fusión. En consecuencia, las actividades de las proteínas de fusión de FGF21 fusionadas a Fc, en las que se introducen mutaciones en FGF21, pueden alterarse dependiendo de la presencia/ausencia o la ubicación de la fusión. En segundo lugar, debe lograrse un perfil farmacocinético que permita la administración con un intervalo de una vez por semana en seres humanos gracias al aumento de la semivida *in vivo*. En tercer lugar, teniendo en cuenta que puede esperarse inmunogenicidad en la mayoría de los pacientes tras la administración de productos biofarmacéuticos, debe minimizarse el riesgo de inmunogenicidad debido a un enlazador de fusión o una mutación. En cuarto lugar, no deben surgir problemas de estabilidad derivados de la posición de la fusión o de la introducción de la mutación. En quinto lugar, dado que pueden producirse respuestas inmunitarias no deseadas dependiendo de los isotipos de inmunoglobulina fusionada, es necesaria una solución para prevenir tales respuestas.

Ya se ha notificado un intento de desarrollar una proteína de fusión de acción prolongada uniendo la región Fc de una inmunoglobulina G (IgG) a una molécula de FGF21 (véase el documento WO 2013/188181). En el caso de una estructura Fc-FGF21, donde el Fc se fusiona al extremo N-terminal de FGF21 de tipo silvestre, si bien no hay una diferencia clara en la actividad *in vitro* en comparación con la de FGF21 de tipo silvestre, se sabe que la semivida es muy corta debido a la degradación *in vivo* de la proteína. Para abordar este problema, se ha intentado mejorar la semivida *in vivo* introduciendo varias mutaciones en ubicaciones de sitios específicos de FGF21 para resistir la degradación proteica. Sin embargo, el riesgo de inmunogenicidad puede aumentar con la introducción de múltiples mutaciones. Por el contrario, en el caso de una estructura FGF21-Fc, donde el Fc se fusiona al extremo C-terminal de la molécula de FGF21, se sabe que hay una disminución significativa de la actividad provocada por la fusión en este sitio en comparación con la estructura Fc-FGF21.

La administración combinada de GLP-1 y FGF21 puede tener un efecto sinérgico en comparación con la administración individual, dependiendo de los mecanismos de acción y los tejidos diana en el cuerpo, y se espera una eficacia antidiabética potencialmente excepcional y ventajas adicionales. Los efectos de la administración combinada de GLP-1 y FGF21 o de una proteína de doble función GLP-1/FGF21 ya se han investigado y publicado (véanse los documentos WO 2010/142665 y WO 2011/020319).

Deben resolverse diversos problemas para desarrollar una proteína de doble función que comprenda GLP-1 y FGF21. Dado que GLP-1 de tipo silvestre y FGF21 de tipo silvestre tienen una semivida *in vivo* muy corta, se requiere que se administren al menos una vez al día, incluso si se desarrollan como agentes terapéuticos. En consecuencia, se requieren tecnologías de acción prolongada, como una fusión a Fc, para desarrollar una proteína de doble función de acción prolongada que mejore la comodidad para los pacientes. En un fármaco de doble función para las dos dianas de GLP-1 y FGF21, la introducción de mutaciones es esencial para mantener la actividad y la estabilidad *in vivo* de cada fármaco, y deben abordarse los problemas asociados con los cambios en la actividad, la estructura o la estabilidad provocados por cada mutación. Los efectos medicinales para las dos dianas de GLP-1 y FGF21 deben estar bien equilibrados y se requieren para este fin diseños de fármacos que tengan en cuenta las actividades *in vitro*, los perfiles farmacocinéticos, la eficacia farmacológica en modelos animales así como la evaluación clínica de la eficacia en seres humanos. Una proteína de doble función tiene una estructura que no puede existir en un cuerpo humano y es estructuralmente compleja en comparación con una proteína de fusión para una sola diana. Además, dado que se requiere mutación o ingeniería de enlazadores para equilibrar las dos dianas, puede aumentar la

posibilidad de formar complejos de agregados y puede requerirse ingeniería de proteínas adicional para evitarlo. Además, la inmunogenicidad potencial puede aumentar debido a nuevas secuencias de mutación o estructuras complejas, que deben abordarse o evitarse.

5 Los presentes inventores se han esforzado por mejorar la estabilidad, los perfiles farmacocinéticos y la eficacia farmacológica de las proteínas de doble función, incluidas proteínas mutantes de GLP-1 y proteínas mutantes de FGF21, y descubrieron que la estabilidad, los perfiles farmacocinéticos y la eficacia farmacológica de las proteínas de doble función pueden mejorarse cuando una proteína mutante de GLP-1 se fusiona a una región Fc de una inmunoglobulina y una nueva proteína mutante de FGF21 se fusiona a la misma, logrando de este modo la presente invención.

10 **Divulgación de la invención**

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de doble función que incluye una proteína biológicamente activa y una proteína mutante de FGF21 con parámetros farmacocinéticos mejorados, alta estabilidad, baja posibilidad de formar complejos de agregación e inmunogenicidad potencial reducida.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que incluye la proteína de doble función para prevenir o tratar trastornos asociados a FGF21.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de doble función, un vector de expresión que incluye la molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que incluye el vector de expresión.

20 Solución al problema

La presente invención proporciona una proteína de doble función, una proteína de doble función para su uso, una composición farmacéutica para su uso, una molécula de ácido nucleico aislada, un vector de expresión y una célula hospedadora como se define en las reivindicaciones adjuntas.

25 La presente invención proporciona una proteína de doble función que comprende una proteína mutante de FGF21; una proteína biológicamente activa; y una región Fc de una inmunoglobulina, en donde la proteína mutante de FGF21 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 11 a 15 y 20 a 23;

en donde la proteína biológicamente activa es una seleccionada del grupo que consiste en péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), un mutante de GLP-1 y exendina-4, en donde el mutante de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 43 a 46; y

30 en donde la proteína de doble función comprende además un enlazador, en donde el enlazador conecta la proteína mutante de FGF21 a la región Fc de la inmunoglobulina.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de doble función de la invención para su uso en el tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares.

35 Además, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de doble función, un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que comprende el vector de expresión.

Efectos ventajosos de la invención

40 Una proteína de doble función de la presente invención, preparada mediante la unión de una proteína biológicamente activa y una proteína mutante de FGF a una región Fc de una inmunoglobulina, tiene una eficacia farmacológica, duración *in vivo* y estabilidad proteica mejoradas. Además, una composición farmacéutica que incluye la proteína de doble función como principio activo puede usarse como agente terapéutico para diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedades de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares.

45 **Breve descripción de los dibujos**

Las FIGS. 1A a 1C son gráficos que muestran las actividades *in vitro* de proteínas de fusión que incluyen proteínas mutantes de FGF21 (a continuación en el presente documento, "proteína de fusión mutante de FGF21") usando una línea celular HEK293 en la que se sobreexpresa β -klotho humano. Ninguna proteína de fusión mutante de FGF21 mostró una disminución significativa de la actividad debido a la introducción de una mutación.

50 Las FIGS. 2A y 2B son gráficos que muestran las actividades *in vitro* de las proteínas de fusión mutantes de FGF21 con diversos enlazadores que conectan el extremo N-terminal de FGF21 a una región Fc, usando una línea celular

HEK293 en la que se sobreexpresa β -klotho humano. Ninguna proteína de fusión mutante de FGF21 mostró una disminución significativa de la actividad, aunque se mostró una ligera diferencia en la actividad dependiendo de la secuencia del enlazador.

5 La FIG. 3 es un gráfico que muestra las actividades *in vitro* de RGE (Amgen), Fc-FGF21 (Lilly) y DFD1 usando una línea celular HEK293 en la que se sobreexpresa β -klotho humano. DFD1 y RGE (Amgen) tuvieron actividades similares, mientras que Fc-FGF21 (Lilly) tuvo una actividad *in vitro* dos veces mayor que las otras proteínas.

10 La FIG. 4 muestra la estabilidad de DFD4 y la de DFD13 para confirmar el efecto de la mutación EIRP de FGF21 sobre la estabilidad de la proteína de fusión. Se confirmó que DFD13 estaba asociada con una menor tasa de agregados de alto peso molecular (% de HMW) en la fase inicial y en un punto temporal de más de 2 semanas después en comparación con DFD4, lo que indica que la introducción de la mutación EIRP mejora la estabilidad de la proteína de fusión mutante de FGF21, reduciendo así significativamente el % de HMW.

La FIG. 5 muestra la concentración de cada proteína en la sangre a lo largo del tiempo durante 96 horas después de la administración subcutánea de proteínas de fusión mutantes de FGF21. Los datos se indican como valores medios y desviación estándar.

15 La FIG. 6 muestra los niveles de glucosa en sangre en un modelo de ratón *ob/ob* tras una única inyección subcutánea de DFD18, DFD72, DFD74 o Fc-FGF21 (Lilly). DFD18, DFD72 y DFD74 tuvieron un efecto de disminución continua del nivel de glucosa en sangre. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media (EEM).

20 La FIG. 7 muestra gráficos que indican los cambios en los pesos corporales en el modelo de ratón *ob/ob* desde el día de la administración hasta el 14^º día después de una única inyección subcutánea de DFD18, DFD72, DFD74 o Fc-FGF21 (Lilly). DFD18, DFD72 y DFD74 tuvieron un efecto de reducción del peso corporal en comparación con el grupo tratado con PBS. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

25 La FIG. 8 muestra gráficos que indican los cambios en los niveles de hemoglobina glucosilada en el modelo de ratón *ob/ob* el día de la administración (1^{er} día) y el 16^º día después de una única inyección subcutánea de DFD18, DFD72, DFD74 o Fc-FGF21 (Lilly). DFD18, DFD72 y DFD74 redujeron los niveles de hemoglobina glucosilada el 16^º día en comparación con los del día de la administración. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

La FIG. 9 muestra los niveles de glucosa en sangre en un modelo de ratón HFD/STZ después de una única inyección subcutánea de DFD72 o DFD74. Tanto DFD72 como DFD74 tuvieron el efecto de reducción continua del nivel de glucosa en sangre. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

30 La FIG. 10 muestra los cambios en los pesos corporales de los animales en el modelo de ratón HFD/STZ desde el día de la administración hasta el 14^º día después de una única inyección subcutánea de DFD72 o DFD74. Tanto DFD72 como DFD74 tuvieron el efecto de reducir el peso corporal en comparación con el grupo tratado con PBS. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

35 La FIG. 11 muestra gráficos que indican los cambios en los niveles de hemoglobina glucosilada en el modelo de ratón HFD/STZ el 1^{er} día y el 13^{er} día después de una única inyección subcutánea de DFD72 o DFD74. Se observó que tanto DFD72 como DFD74 dieron como resultado una mayor reducción de los niveles de hemoglobina glucosilada en comparación con el grupo tratado con PBS. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

40 La FIG. 12 muestra los cambios en los pesos corporales medidos en el modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta desde el día de la administración hasta el 14^º día después de una única administración de DFD18. DFD18 tuvo un efecto significativo sobre la reducción del peso corporal. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

45 La FIG. 13 es un gráfico que muestra las actividades *in vitro* de GLP-1 de proteínas de doble función dependiendo de las bisagras que unen el extremo C-terminal de mutantes de GLP-1 y GLP-1 a la región Fc usando una línea celular CHO en la que se sobreexpresa el receptor de GLP-1 humano. En general, la proteína de doble función que incluye una secuencia de GLP-1 (A2G) (DFD23) mostró una actividad de 2 a 3 veces menor que la de otras proteínas de doble función que incluyen otras secuencias mutantes de GLP-1. No se observó ninguna diferencia significativa en las actividades de GLP-1 entre las proteínas de doble función que incluyen secuencias mutantes, excepto la secuencia de GLP-1 (A2G).

50 La FIG. 14 muestra gráficos que indican las actividades de GLP-1 de DFD59, DFD69, DFD112 y DFD114 y las actividades de FGF21 de DFD69, DFD112 y DFD114. Se midieron las actividades de GLP-1 *in vitro* de tres proteínas de doble función (DFD69, DFD112 y DFD114) y del mutante de GLP-1 fusionado a Fc que no incluye FGF21 (DFD59) usando una línea celular CHO en la que se sobreexpresa el receptor de GLP-1 humano. Las tres proteínas de doble función mostraron valores de CE₅₀ similares, y el mutante de GLP-1 fusionado a Fc (DFD59) mostró una actividad aproximadamente 2 veces mayor que la de las proteínas de doble función. Se midieron las actividades *in vitro* de las proteínas de doble función que dependen de mutantes de FGF21 usando una línea celular HEK293 en la que se sobreexpresa β -klotho humano. Se confirmó que las actividades *in vitro* de la porción FGF21 eran similares en las tres

proteínas de doble función.

La FIG. 15 muestra las concentraciones de proteínas en la sangre frente al tiempo durante 240 horas después de la administración subcutánea de proteínas de doble función. Los datos se indican como valores medios y desviación estándar.

5 La FIG. 16 muestra los niveles de glucosa en sangre en un modelo de ratón *db/db* tras una única inyección subcutánea de DFD114 o DFD59 y una única inyección subcutánea de una combinación de DFD59 y DFD74. Los grupos tratados con proteínas de doble función mostraron efectos más fuertes sobre la reducción de los niveles de glucosa en sangre que los tratados con proteínas de función única. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media (EEM).

10 La FIG. 17 muestra gráficos que indican los cambios en los pesos corporales en el modelo de ratón *db/db* desde el día de la administración hasta el 14^º día después de una única inyección subcutánea de DFD114 o DFD59 y una única inyección subcutánea de una combinación de DFD59 y DFD74. Los grupos tratados con proteínas de doble función mostraron efectos más fuertes sobre la reducción del peso corporal que los tratados con proteínas de función única. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media (EEM).

15 La FIG. 18 muestra gráficos que indican los cambios en los niveles de hemoglobina glucosilada en un modelo de ratón *db/db* el día de la administración (1^{er} día) y el 16^º día después de una única inyección subcutánea de DFD114 o DFD59 y una única inyección subcutánea de una combinación de DFD59 y DFD74. Los grupos tratados con proteínas de doble función mostraron efectos más fuertes sobre la reducción de los niveles de hemoglobina glucosilada que los tratados con proteínas de función única o una combinación de las mismas. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

20 La FIG. 19 muestra los niveles de glucosa en sangre en un modelo de ratón HFD/STZ después de una única inyección subcutánea de DFD114, DFD59, DFD74 o DFD72 y una única inyección subcutánea de una combinación de DFD59 y DFD74. Los grupos tratados con proteínas de doble función mostraron efectos más fuertes sobre la reducción de los niveles de glucosa en sangre que los tratados con proteínas de función única. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media (EEM).

25 La FIG. 20 muestra los cambios en los pesos corporales en el modelo de ratón HFD/STZ desde el día de la administración hasta el 14^º día después de una única inyección subcutánea de DFD59, DFD72, DFD74 o DFD114 y una única inyección subcutánea de una combinación de DFD59 y DFD74. Los grupos tratados con proteínas de doble función mostraron efectos más fuertes sobre la reducción del peso corporal que los tratados con proteínas de función única. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media (EEM).

30 La FIG. 21 muestra los cambios en los niveles de hemoglobina glucosilada en el modelo de ratón HFD/STZ el día de la administración (1^{er} día) y el 16^º día después de una única inyección subcutánea de DFD59, DFD72, DFD74 o DFD114 y una única inyección subcutánea de una combinación de DFD59 y DFD74. Los grupos tratados con proteínas de doble función mostraron efectos más fuertes sobre la reducción de los niveles de hemoglobina glucosilada que los tratados con proteínas de función única o una combinación de las mismas. Los datos se indican como valores medios y error estándar de la media.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se describirá con más detalle la presente invención.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de doble función que comprende una proteína mutante de factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21); una proteína biológicamente activa; y una región Fc de una inmunoglobulina, en donde la proteína mutante de FGF21 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 11 a 15 y 20 a 23;

45 en donde la proteína biológicamente activa es una seleccionada del grupo que consiste en péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), un mutante de GLP-1 y exendina-4, en donde el mutante de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 43 a 46; y

en donde la proteína de doble función comprende además un enlazador, en donde el enlazador conecta la proteína mutante de FGF21 a la región Fc de la inmunoglobulina.

50 La proteína FGF21 de tipo silvestre, una hormona que se sabe que desempeña un papel importante en la homeostasis de la glucosa y los lípidos, puede ser una derivada de mamíferos como seres humanos, ratones, cerdos, monos, etc., preferiblemente de seres humanos. Más preferiblemente, la proteína FGF21 de tipo silvestre puede ser la proteína FGF21 humana de tipo silvestre que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

La mutación incluida en la proteína mutante de FGF21 es la mutación de EIRP; o una combinación de una cualquiera de las mutaciones de TGLEAV, TGLEAN, G170N y G174N y la mutación de EIRP; o una combinación de la mutación de EIRP y la mutación de A180E; o una combinación de una cualquiera de las mutaciones de TGLEAV, TGLEAN,

G170N y G174N, la mutación de EIRP y la mutación de A180E. La proteína mutante de FGF21 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 11 a 15 y 20 a 23.

En la proteína de doble función, un residuo de aminoácido N de la proteína mutante de FGF21 introducido por una mutación puede estar glicosilado.

- 5 La proteína biológicamente activa es una seleccionada de GLP-1, un mutante de la misma y exendina-4, en donde el mutante de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 43 a 46.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "región Fc", "fragmento Fc" o "Fc" se refiere a una proteína que incluye una región constante de cadena pesada 1 (CH1), una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, pero no incluye regiones variables de las cadenas pesada y ligera y una región constante de cadena ligera 1 (CL1) de una inmunoglobulina. Además, tal como se usa en el presente documento, el término "mutante de región Fc" se refiere a una región preparada sustituyendo parte de los aminoácidos de una región Fc o combinando regiones Fc de diferentes tipos.

15 La región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc completa que constituye un anticuerpo, un fragmento de la misma o un mutante de la región Fc. Además, la región Fc incluye una molécula en forma de monómero o multímero, y puede incluir además una región bisagra de la región constante de cadena pesada. El mutante de la región Fc puede modificarse para evitar la escisión en la región bisagra. Además, la secuencia bisagra de la Fc puede tener una sustitución en algunas secuencias de aminoácidos para reducir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Además, parte de la secuencia de aminoácidos de la secuencia bisagra de Fc puede sustituirse para inhibir la reorganización de la región Fab. Puede eliminarse un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la Fc.

20 Preferiblemente, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una cualquiera de las regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgD; o una Fc híbrida, que es una combinación de las mismas. Además, la Fc híbrida puede incluir una región de IgG4 y una región de IgD. Además, la región Fc híbrida puede incluir parte de la secuencia de bisagra y CH2 de una Fc de IgD, y secuencias CH2 y CH3 de una Fc de IgG4.

25 Además, el fragmento Fc de la presente invención puede estar en forma de cadena glicosilada de tipo silvestre, cadena más glicosilada que la de tipo silvestre, cadena menos glicosilada que la de tipo silvestre o cadena desglucosilada. El aumento, la disminución o la eliminación de la cadena glicosilada puede realizarse mediante un método convencional conocido en la técnica, como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética usando microorganismos.

30 Preferiblemente, la región Fc de inmunoglobulina puede estar representada por una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a 26, 47 y 48.

35 La proteína de doble función puede incluir una proteína biológicamente activa, una región Fc de una inmunoglobulina y una proteína mutante de FGF21, unidas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Además, la proteína de doble función puede incluir una proteína mutante de FGF21, una región Fc de una inmunoglobulina y una proteína biológicamente activa, unidas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Preferiblemente, la proteína de doble función puede incluir una proteína biológicamente activa, una región Fc de una inmunoglobulina y una proteína mutante de FGF21, unidas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

40 Además, la proteína de doble función puede incluir una proteína mutante de GLP-1, una región Fc de una inmunoglobulina y una proteína mutante de FGF21, unidas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Además, la proteína de doble función puede incluir una proteína mutante de FGF21, una región Fc de una inmunoglobulina y una proteína mutante de GLP-1, unidas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Preferiblemente, la proteína de doble función puede incluir una proteína mutante de GLP-1, una región Fc de una inmunoglobulina y una proteína mutante de FGF21, unidas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

45 La proteína de doble función incluye además un enlazador, en donde el enlazador conecta la proteína mutante de FGF21 a la región Fc de la inmunoglobulina.

50 El enlazador puede estar conectado al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un radical libre del fragmento Fc y, además, puede estar conectado al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un radical libre de la proteína mutante de FGF21. Cuando el enlazador es un enlazador peptídico, la conexión puede producirse en cualquier región. Por ejemplo, el enlazador puede estar conectado al extremo C-terminal de la región Fc de inmunoglobulina y al extremo N-terminal de la proteína mutante de FGF21 para formar una proteína de fusión de la región Fc de inmunoglobulina y la proteína mutante de FGF21.

55 Además, la proteína de doble función de la presente invención puede estar en la forma en la que una proteína biológicamente activa está unida al extremo N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina de la proteína de fusión.

- 5 Cuando el enlazador y el Fc se expresan por separado y luego se conectan, el enlazador puede ser un agente de reticulación conocido en la técnica. Los ejemplos del agente de reticulación pueden incluir 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, imidoésteres que incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida, como ácido 4-azidosalicílico, y ésteres de disuccinimidilo, como 3,3'-ditiobis(succinimidilopropionato), y maleimidas bifuncionales, como bis-N-maleimido-1,8-octano, pero no se limitan a los mismos.
- Además, el enlazador puede ser un péptido. Preferiblemente, el enlazador puede ser un péptido que consiste en de 10 a 30 residuos de aminoácidos.
- Además, puede estar unida adicionalmente alanina al extremo del enlazador. Preferiblemente, el enlazador puede ser un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 5.
- 10 La proteína de doble función puede estar en una forma en la que un dímero o multímero de proteínas mutantes de FGF21, en las que una o más proteínas mutantes de FGF21 están unidas entre sí, está conectado a una región Fc de inmunoglobulina. Además, la proteína de doble función puede estar en una forma de dímero o multímero en la que dos o más regiones Fc de inmunoglobulina están unidas, en donde las regiones Fc de inmunoglobulina tienen la proteína mutante de FGF21 conectada a las mismas.
- 15 Además, la proteína de doble función puede ser un péptido que preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 58 a 67. Más preferiblemente, la proteína de doble función puede ser un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, 66 o 67.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene la proteína de doble función para su uso en el tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares.
- 20 Además, la composición farmacéutica puede incluir además un portador farmacéutico. El portador farmacéutico puede ser cualquier portador, siempre que sea un material no tóxico adecuado para administrar anticuerpos a los pacientes. Por ejemplo, pueden incluirse como portadores agua destilada, alcohol, grasas, ceras y sólidos inactivos. También pueden incluirse en la composición farmacéutica adyuvantes farmacéuticamente aceptables (agentes tamponantes, dispersantes). En estas formulaciones, la concentración de la proteína de doble función puede variar en gran medida.
- 25 Específicamente, la composición farmacéutica puede contener un material de formulación para alterar, mantener o conservar el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la permeabilidad de la composición. Los ejemplos del material de formulación adecuado pueden incluir aminoácidos (por ejemplo, glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), agentes antimicroorganismos, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, sulfito de sodio o bisulfito de sodio), agentes tamponantes (por ejemplo, borato, bicarbonatos, Tris-HCl, citrato, fosfato u otros ácidos orgánicos), agentes de carga (por ejemplo, manitol o glicina), agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), agentes complejantes (por ejemplo, cafeína, polivinilpirrolidona, β -ciclodextrina o hidroxipropil- β -ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa o dextrina), proteínas (por ejemplo, albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulina), agentes colorantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, polímeros hidrófilos (p. ej., polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sal (p. ej., sodio), conservantes (p. ej., cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (p. ej., glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcar (p. ej., manitol o sorbitol),
- 30 agentes de suspensión, surfactantes o humectantes (p. ej., pluronics; PEG; éster de sorbitán; polisorbato, p. ej., polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapol), mejoradores de la estabilidad (p. ej., sacarosa o sorbitol), mejoradores del crecimiento (p. ej., haluros de metales alcalinos, preferiblemente, cloruro de sodio o cloruro de potasio; o manitol, sorbitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos, pero no se limitan a los mismos.
- 35
- 40
- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína de doble función de la invención para su uso en el tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares. El tratamiento incluye administrar la proteína de doble función a un sujeto que necesita tal tratamiento, en particular, administrar una cantidad eficaz de la proteína de doble función de la presente invención a un mamífero que tiene un síntoma de diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares que sean trastornos asociados a FGF21.
- 50
- 55 La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía. La composición puede administrarse a un animal directamente (por ejemplo, por vía tópica, mediante la administración en áreas de tejido mediante inyección, trasplante o mediante administración tópica) o sistémicamente (por ejemplo, mediante administración oral o parenteral) mediante cualquier medio apropiado. Cuando la composición se administra por vía parenteral mediante administración intravenosa, subcutánea, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, oral, rectal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracistenal, intracapsular, intranasal o en aerosol, la composición es preferiblemente acuosa o puede incluir una parte de una suspensión o solución de líquido corporal fisiológicamente

aplicable. En consecuencia, el portador o vehículo puede añadirse a la composición y administrarse a un paciente, ya que es fisiológicamente aplicable. Por lo tanto, una solución salina fisiológicamente apropiada puede incluirse generalmente como portador, como un fluido corporal para formulaciones.

5 Además, la frecuencia de administración puede variar dependiendo de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de doble función en las formulaciones que van a usarse. Normalmente, los médicos administrarían la composición hasta que se alcance una dosis de administración para lograr un efecto deseado. En consecuencia, la composición puede administrarse como una dosis unitaria, al menos dos dosis con intervalos de tiempo (pueden contener o no la misma cantidad de una proteína de doble función objetivo) o administrarse mediante una inyección continua por medio de un dispositivo de trasplante o catéter. La precisión de la adición de una dosis de administración apropiada pueden
10 realizarla rutinariamente los expertos en la materia y corresponde al alcance del trabajo que realizan rutinariamente.

Además, la dosis unitaria preferible de la proteína de doble función en seres humanos puede estar en un intervalo de 0,01 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente de 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Aunque esta es la cantidad óptima, la dosis unitaria puede variar dependiendo de la enfermedad que va a tratarse o de la presencia/ausencia de efectos adversos. No obstante, la dosis de administración óptima puede determinarse
15 realizando un experimento convencional. La administración de la proteína de doble función puede realizarse mediante una inyección en bolo periódica, un depósito externo (por ejemplo, una bolsa intravenosa) o una administración intravenosa, subcutánea o intraperitoneal continua desde la fuente interna (por ejemplo, un implante bioerosionable).

Además, la proteína de doble función de la presente invención puede administrarse a un sujeto receptor junto con otras moléculas biológicamente activas. La combinación óptima de la proteína de doble función y otra(s) molécula(s),
20 formas de dosificación y dosis óptimas puede determinarse mediante un experimento convencional bien conocido en la técnica.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de doble función.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico de la presente invención, que se aísla de aproximadamente al menos el 50 % de proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales, descubiertos en la naturaleza cuando se aíslan los ácidos nucleicos totales de una célula fuente; que está operativamente unida a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza; o que forma parte de una secuencia de polinucleótido más grande y no se produce en la naturaleza. Preferiblemente, en las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, no hay sustancialmente presentes otros ácidos
30 nucleicos contaminados u otros contaminantes que se descubran en el entorno natural e inhiban los usos de los ácidos nucleicos en la producción de polipéptidos, o el tratamiento, diagnóstico, prevención o investigación.

En tal caso, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la proteína de doble función pueden tener secuencias diferentes entre sí debido a la redundancia de codones. Además, siempre que el ácido nucleico aislado pueda producir la proteína de doble función, el ácido nucleico aislado puede modificarse apropiadamente, o puede
35 añadirse un nucleótido al extremo N-terminal o C-terminal del ácido nucleico aislado según los fines deseados.

El ácido nucleico aislado puede incluir, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos representada por una cualquiera de SEQ ID NO: 71 a 80.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislada.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico, que es adecuada para la transformación de una célula hospedadora y dirige o controla la expresión de una secuencia de ácido nucleico heterogénea insertada. El vector de expresión incluye un ácido nucleico lineal, un plásmido, un fagémido, un cósmido, un vector de ARN, un vector viral y análogos de los mismos. Los ejemplos del vector viral incluyen un retrovirus, un adenovirus y un virus adenoasociado, pero no se limitan a los
45 mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "expresión de una secuencia de ácido nucleico heterogénea" o "expresión" de una proteína diana se refiere a la transcripción de una secuencia de ADN insertada, la traducción de un transcrito de ARNm y la producción de un producto de proteína de fusión de Fc, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

50 Un vector de expresión útil puede ser RcCMV (Invitrogen, Carlsbad) o un mutante del mismo. El vector de expresión útil puede incluir un promotor de citomegalovirus (CMV) humano para promover una transcripción continua de un gen diana en una célula de mamífero, y una secuencia de señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina para mejorar el nivel de estabilidad postranscripcional del ARN. En una realización a modo de ejemplo de la presente invención, el vector de expresión es pAD15, que es un vector modificado de RcCMV.

55 En otro aspecto más, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de expresión.

Como se usa en el presente documento, el término “célula hospedadora” se refiere a una célula procariota o eucariota en la que puede introducirse un vector de expresión recombinante. Como se usa en el presente documento, el término “transformado” o “transfectado” se refiere a la introducción de un ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante diversas tecnologías conocidas en la técnica.

- 5 Una célula hospedadora apropiada puede transformarse o transfectarse con una secuencia de ADN de la presente invención y puede usarse para la expresión y/o secreción de la proteína diana. Los ejemplos de la célula hospedadora apropiada que puede usarse en la presente invención incluyen células de hibridoma inmortales, células de mieloma NS/O, células 293, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células CAP (células derivadas de líquido amniótico humano) y células COS.
- 10 A continuación se describirán en detalle realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos según la presente invención pueden modificarse de muchas formas diferentes y el alcance de la presente invención no debe interpretarse como limitado a los ejemplos expuestos en el presente documento.

Modo de la invención

- 15 Ejemplo de preparación 1. Preparación y purificación de la proteína de fusión que contiene la proteína mutante de FGF21

Ejemplo de preparación 1-1. Preparación de vectores de expresión para la expresión de proteínas mutantes de FGF21

Con el fin de mejorar la estabilidad, la actividad y los perfiles farmacocinéticos de la FGF21 en una estructura Fc-FGF21, se realizaron estudios de mutación de FGF21.

- 20 Específicamente, se diseñaron proteínas mutantes para la región LLLLE (los aminoácidos en las posiciones 98 a 101 desde el extremo N-terminal de la proteína FGF21) y la región GPSQG (los aminoácidos en las posiciones 170 a 174 desde el extremo N-terminal de la proteína FGF21), y el sitio A180, que se esperaba que afectaran significativamente las actividades de la proteína basándose en el análisis de la estructura tridimensional de las proteínas FGF21.

- 25 La posición, la información de secuencia, el objetivo y el efecto esperado de cada mutación introducida en la proteína FGF21 se enumeran en la tabla 1 a continuación (en la tabla 1, N se refiere a asparagina glicosilada (N)). Además, las proteínas mutantes de FGF21 que incluyen las mutaciones descritas en la tabla 1 se enumeran en la tabla 2 a continuación.

[Tabla 1]

Secuencia	Posición	Secuencia original	Secuencia mutada	Objetivo	Efecto esperado
EIRP	98-101	LLLE	EIRP	Sustitución con la secuencia de FGF19	Mejora de la estabilidad y la farmacocinética
TGLEAV	170-174	GPSQG	TGLEAV	Sustitución con la secuencia de FGF19	Mejora de la farmacocinética
TGLEAN	170-174	GPSQG	TGLEAN	Sustitución con la secuencia de FGF19 y adición de N-glicosilación	Mejora de la farmacocinética
G170N	170	G	<u>N</u>	Mutación puntual y adición de N-glicosilación	Mejora de la farmacocinética
G174N	174	G	<u>N</u>	Mutación puntual y adición de N-glicosilación	Mejora de la farmacocinética
A180E	180	A	E	Mutación puntual	Mejora de la farmacocinética

ES 3 013 110 T3

[Tabla 2]

SEQ ID NO	Secuencia de la proteína mutante de FGF21
6	FGF21 (EIRP)
7	FGF21 (TGLEAV)
8	FGF21 (TGLEAN)
9	FGF21 (G170N)
10	FGF21 (G174N)
11	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
12	FGF21 (EIRP, TGLEAN)
13	FGF21 (EIRP, G170N)
14	FGF21 (EIRP, G174N)
15	FGF21 (EIRP, A180E)
16	FGF21 (TGLEAV, A180E)
17	FGF21 (TGLEAN, A180E)
18	FGF21 (G170N, A180E)
19	FGF21 (G174N, A180E)
20	FGF21 (EIRP, TGLEAV, A180E)
21	FGF21 (EIRP, TGLEAN, A180E)
22	FGF21 (EIRP, G170N, A180E)
23	FGF21 (EIRP, G174N, A180E)

5 Se prepararon vectores de expresión para expresar los aminoácidos de los tres componentes: portador de fusión, enlazador y mutante de FGF21 en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. El código de material de cada proteína de fusión mutante de FGF21, la secuencia de mutación introducida en FGF21, la secuencia del transportador de fusión y la secuencia del enlazador se enumeran en la tabla 3 a continuación (en la Tabla 3, N se refiere a asparagina glicosilada (N)).

[Tabla 3]

SEQ ID NO	Código de material	Secuencia de mutación de FGF21	Portador de fusión	Secuencia de enlazador
27	DFD1	EIRP, TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	C (SEQ ID NO: 2)
28	DFD3	TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	AKA (SEQ ID NO: 3)
29	DFD4	TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
30	DFD5	TGLEA <u>N</u>	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
31	DFD6	G170 <u>N</u>	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
32	DFD6 (<i>E. coli</i>)	G170N	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
33	DFD7	G174 <u>N</u>	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 ((SEQ ID NO: 4)
34	DFD9	ninguna	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
35	DFD13	EIRP, TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
36	DFD18	EIRP, TGLEAV, A180E	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
37	DFD72	EIRP, TGLEA <u>N</u> A180E	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
38	DFD73	EIRP, G170 <u>N</u>	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
39	DFD74	EIRP, G170 <u>N</u> , A180E	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
40	RGE (Amgen)	L98R, P171G, A180E	Mutante de IgG1Fc	GS3 (SEQ ID NO: 4)
41	Fc-FGF21 (Lilly)	X	Mutante de IgG4Fc (SEQ ID NO: 25)	GS3A (SEQ ID NO: 5)

Para producir las proteínas de fusión mutantes de FGF21, las secuencias de nucleótidos que codifican cada una de las proteínas mutantes de FGF21 se sintetizaron consultando con Bioneer Corporation (Corea) basándose en la secuencia de aminoácidos de cada proteína. Se añadieron las secuencias de enzimas de restricción *NheI* y *NotI* al extremo 5' y al extremo 3' de las secuencias de nucleótidos que codifican cada una de las proteínas mutantes de FGF21 y se insertaron un codón de iniciación para la traducción de proteínas y una secuencia líder (MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPSHA) capaz de secretar la proteína expresada al exterior de una célula junto a la secuencia de enzimas de restricción en el extremo 5'. Se insertó un codón de terminación junto a la secuencia de nucleótidos que codifica cada una de las proteínas de fusión mutantes de FGF21. La secuencia de nucleótidos que codifica cada una de las proteínas de fusión mutantes de FGF21 se clonó en un vector de expresión pTrans-empty usando las dos enzimas de restricción de *NheI* y *NotI*. El vector de expresión pTrans-empty, que tiene una estructura simple que incluye un promotor de CMV, un origen de replicación derivado de pUC, un origen de replicación derivado de SV40 y un gen resistente a la ampicilina, se adquirió de CEVEC Pharmaceuticals (Alemania).

En el caso de las proteínas de fusión de DFD6 (*E. coli*) y RGE (Amgen), la secuencia de nucleótidos que codifica cada proteína de fusión se insertó en un vector de expresión pET30a para su expresión en *E. coli*.

Ejemplo de preparación 1-2. Construcción de ADN plasmídico para la expresión de proteínas de fusión mutantes de FGF21

Se transformó *E. coli* con cada uno de los vectores de expresión construidos en el Ejemplo de preparación 1-1 para obtener una gran cantidad de ADN plasmídico que va a usarse para la expresión. Se transformaron células de *E. coli*, cuyas paredes celulares estaban debilitadas, con cada vector de expresión mediante choque térmico y los transformantes se sembraron en placas LB para obtener colonias. Las colonias así obtenidas se inocularon en medio LB, se cultivaron a 37 °C durante 16 horas y se obtuvo cada cultivo de *E. coli* que contenía cada vector de expresión en un volumen de 100 ml. La *E. coli* así obtenida se centrifugó para eliminar el medio de cultivo y luego se añadieron soluciones P1, P2, P3 (QIAGEN, n.º de cat.: 12963) para romper las paredes celulares, obteniendo de ese modo una suspensión de ADN en la que las proteínas y los ADN estaban separados. El ADN plasmídico se purificó de la suspensión de ADN así obtenida usando una columna de purificación de ADN de Qiagen. El ADN plasmídico eluido se identificó a través de una electroforesis en gel de agarosa y las concentraciones y purezas se midieron usando un dispositivo Nanodrop (Thermo scientific, Nanodrop Lite). El ADN así obtenido se usó para la expresión.

Ejemplo de preparación 1-3. Expresión de proteínas de fusión en células CAP-T

Se transfectaron líneas celulares humanas con cada tipo de ADN plasmídico obtenido en el Ejemplo de preparación 1-2. Cada tipo de ADN plasmídico se transdujo en células CAP-T (CEVEC), que se habían cultivado en medio PEM (Life Technologies), usando una solución de PEI (Polyplus, n.º de cat.: 101-10N). La solución mixta de ADN y la solución de PEI se mezcló con la suspensión celular usando un medio de expresión Freestyle293 (Invitrogen), se cultivó a 37 °C durante 5 horas y se añadió medio PEM. Después de cultivar a 37 °C durante 5-7 días, el cultivo se centrifugó para eliminar las células y se obtuvo un sobrenadante que incluía proteínas de fusión mutantes de FGF21.

Ejemplo de preparación 1-4. Expresión y purificación de proteínas de fusión mutantes de FGF21 en *E. coli*

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con cada ADN plasmídico que expresaba DFD6 (*E. coli*) y las proteínas de fusión RGE (Amgen). La *E. coli* transformada que expresa cada proteína de fusión se inoculó en 20 ml de medio LB, se cultivó a 37 °C durante 15 horas con agitación y, a continuación, una parte del medio de cultivo se inoculó en 100 ml de medio LB y se cultivó a 37 °C durante 16 horas con agitación. Una vez finalizado el cultivo, se centrifugó el cultivo para obtener sedimentos de *E. coli*, y, a continuación, las células se rompieron usando un disruptor celular de alta presión para obtener cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión obtenidos se purificaron mediante lavado y elución, seguido de un proceso de replegamiento de proteínas. Específicamente, los cuerpos de inclusión obtenidos se lavaron 2-3 veces con una solución tampón (pH 8,0) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, Tris 50 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0,1 M para eliminar la proteína bacteriana, y luego se resuspendieron en tampón de urea 8 M que contenía urea 8 M, Tris 50 mM y DTT 1 mM. Dado que las proteínas en el tampón de urea 8 M estaban completamente desnaturalizadas, se realizó un proceso de replegamiento de proteínas de la siguiente manera.

Para comenzar, el tampón de urea 8 M se diluyó gradualmente con una solución tampón de glicina 20 mM (pH 9,0) para eliminar la urea y, a partir de la concentración de 2 M, se añadió CuSO₄ a la concentración de 80 µM para inducir el plegamiento estable de las proteínas. La proteína que completó el proceso de replegamiento se suspendió en una solución tampón de PBS (pH 7,4) y la suspensión se filtró con un filtro de 0,22 µm para eliminar las impurezas, y luego se cargó en una columna de cromatografía de afinidad de proteína A. La columna se lavó con una solución tampón de PBS 1X (pH 7,4) y luego las proteínas se eluyeron usando una solución tampón de glicina 100 mM (pH 3,0) para preparar proteína de fusión DFD6 (*E. coli*).

En el caso de la proteína de fusión RGE (Amgen), la proteína que completó el proceso de replegamiento se suspendió en una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0), la suspensión se filtró con un filtro de 0,22 µm para eliminar impurezas y luego se cargó en una columna de resina de intercambio aniónico (POROS® HQ 50 µm, Thermo Fisher Scientific).

La columna se lavó con una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0) y, a continuación, se administró una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0) a lo largo del gradiente de concentración para eluir la proteína de fusión RGE (Amgen). La proteína de fusión RGE (Amgen) obtenida mediante la resina de intercambio aniónico se mezcló con sulfato de amonio a la concentración de 1 M y, a continuación, se purificó usando una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenyl sepharose FF, GE Healthcare). Específicamente, la columna se lavó con una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0) que contenía sulfato de amonio 1 M, se administró una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0) a lo largo del gradiente de concentración y las fracciones eluidas se analizaron mediante electroforesis en gel de Tris-glicina al 10 %. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R con agitación suave y las fracciones que contenían la proteína de fusión mutante de FGF21 con alta pureza se recogieron y luego se dializaron durante la noche a 4 °C usando una solución tampón final (PBS 1X, EDTA 1 mM, pH 7,4). Una vez completada la diálisis, la solución madre de proteína obtenida se concentró a 3000 rpm usando un filtro de centrifugación de corte de 30000 MW a 4 °C. La concentración de la proteína de fusión mutante de FGF21 se midió mediante análisis cuantitativo BCA.

Ejemplo de preparación 1-5. Purificación de proteínas de fusión mutantes de FGF21

La columna de cromatografía de afinidad de proteína A (GE Healthcare) se equilibró con una solución tampón de PBS 1X (pH 7,4). El sobrenadante de cultivo que incluía cada proteína de fusión mutante de FGF21 obtenida en el Ejemplo de preparación 1-3 se filtró con un filtro de 0,2 µm y luego se cargó en una columna de cromatografía de afinidad de proteína A. La columna se lavó con una solución tampón de PBS 1X (pH 7,4) y luego se eluyeron las proteínas usando una solución tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Las proteínas de fusión obtenidas por cromatografía de afinidad se purificaron usando una columna de resina de intercambio aniónico (POROS® HQ 50 µm, Thermo Fisher Scientific). La columna de resina de intercambio aniónico se equilibró con una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0), antes de que las proteínas de fusión mutantes de FGF21 se eluyeran de la columna. Específicamente, después de lavar la columna con una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0), se dispensó una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0) a lo largo del gradiente de concentración y se analizaron las fracciones eluidas. Cada fracción eluida se analizó usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC), y se recogieron las fracciones que incluían proteínas de fusión mutantes de FGF21 con alta pureza. La concentración y el análisis cuantitativo se realizaron según los métodos descritos en el Ejemplo de preparación 1-4.

Ejemplo experimental 1. Actividades *in vitro* de las proteínas de fusión

Ejemplo experimental 1-1. Efecto de las mutaciones de FGF21 sobre la actividad de la proteína

Se midieron las actividades *in vitro* de las proteínas de fusión DFD4, DFD5, DFD6, DFD6 (*E. coli*), DFD7, DFD9, DFD13, DFD18, DFD72, DFD73 y DFD74 preparadas en el Ejemplo de preparación 1.

Específicamente, se evaluaron las actividades de FGF21 *in vitro* de las proteínas de fusión usando una línea celular HEK293 (Yuhan Corporation, Corea) que se modificó para sobreexpresar β-klotho humano, un correceptor de FGF21. Para la evaluación de la actividad, los concentrados que contenían las proteínas de fusión preparadas en los Ejemplos de preparación 1-4 y 1-5 se sometieron a una dilución en serie de 3 veces a una concentración de 3 µM. Después de haberse cultivado en un estado deficiente en suero durante 5 horas, la línea celular que sobreexpresaba β-klotho humano se trató con las proteínas de fusión diluidas durante 20 minutos y luego se lisó añadiendo un tampón de citólisis (Cisbio/n.º de cat. 64ERKPEG) con agitación a 60 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lisado celular se mezcló con anticuerpos (Cisbio/n.º de cat. 64ERKPEG), que pueden detectar la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y ERK fosforilada, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. La fluorescencia se detectó usando un detector fluorométrico (TECAN/GENiosPro). Las actividades de las proteínas de fusión se midieron comparando sus valores de CE₅₀.

Como se muestra en las FIGS. 1A a 1C, se confirmó que las actividades *in vitro* de las proteínas de fusión preparadas introduciendo secuencias de mutación en la proteína FGF21 de tipo silvestre no se inhibieron y las actividades de cada proteína de fusión fueron similares entre sí. También se confirmó que, a través de la muestra DFD6 (*E. coli*) expresada en *E. coli* y la muestra DFD6 expresada en células animales, las actividades *in vitro* de las proteínas de fusión preparadas introduciendo la mutación de N-glicosilación en la proteína FGF21 de tipo silvestre no se inhibieron.

Ejemplo experimental 1-2. Efecto de la secuencia de enlazador sobre la actividad de la proteína

Se midieron las actividades *in vitro* de las proteínas de fusión DFD1, DFD3, DFD4 y DFD13 preparadas en el Ejemplo de preparación 1.

Específicamente, se midieron las actividades de FGF21 de las proteínas de fusión usando los concentrados que contenían las proteínas de fusión preparadas en el Ejemplo de preparación 1-5 según los métodos descritos en el Ejemplo experimental 1-1. Los resultados se muestran en las FIGS. 2A y 2B.

Se confirmó que ninguna proteína de fusión mutante de FGF21 mostró una disminución significativa en la actividad, aunque se mostró una ligera diferencia en la actividad dependiendo de la secuencia de enlazador, como se muestra en las FIGS. 2A y 2B.

ES 3 013 110 T3

Ejemplo experimental 1-3. Resultados experimentales para DFD1, RGE (Amgen) y Fc-FGF21 (Lilly)

Se midieron las actividades *in vitro* de la proteína de fusión DFD1 preparada en el Ejemplo de preparación 1 y las proteínas de control RGE (Amgen) y Fc-FGF21 (Lilly).

5 Específicamente, se midieron las actividades de FGF21 de las proteínas de fusión usando los concentrados que contenían las proteínas de fusión preparadas en el Ejemplo de preparación 1-5 y las proteínas de control según los métodos descritos en el Ejemplo experimental 1-1. Los resultados se muestran en la FIG. 3.

Se confirmó que DFD1 y RGE (Amgen) tenían una actividad *in vitro* similar, mientras que Fc-FGF21 (Lilly) tenía una actividad *in vitro* dos veces mayor que la de las otras proteínas, como se muestra en la FIG. 3.

Ejemplo experimental 2. Evaluación de la estabilidad de las proteínas de fusión

10 Ejemplo experimental 2-1. Método experimental para evaluar la estabilidad

Para medir la cantidad de agregados proteicos en la fase inicial de preparación de la muestra, se cuantificaron los agregados de alto peso molecular (% de HMW) usando un método de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Los resultados se muestran en la FIG. 4.

15 Específicamente, se usó una columna modelo TSK-GEL G3000SW_{XL} de TosoHaas para el método de SEC-HPLC. La columna se equilibró haciendo fluir una solución tampón (PBS 1X, EDTA 1 mM, pH 7,4) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las soluciones madre de proteínas DFD4 y DFD13 preparadas en los Ejemplos de preparación 1-5 se concentraron hasta una concentración objetivo de 20 mg/ml o superior a 3000 rpm usando un filtro de centrifugación de corte de 30000 MW a 4 °C. Después de la medición de la concentración de cada muestra mediante análisis cuantitativo BCA, las muestras se diluyeron con una solución tampón (PBS 1X, EDTA 1 mM, pH 7,4) hasta una
20 concentración final de 20 mg/ml. Para medir el % de HMW inicial de DFD4 y DFD13, se diluyeron 20 mg/ml de las muestras con la solución tampón (PBS 1X, EDTA 1 mM, pH 7,4) hasta una concentración final de 1 mg/ml, y se analizó cada muestra en un volumen de 100 µl mediante una columna de SEC-HPLC.

Para la evaluación de la estabilidad de cada muestra, se midió el % de HMW de las muestras usando el método de SEC-HPLC los días 4, 8 y 14 mientras se almacenaban a 5 °C, 25 °C y 37 °C durante dos semanas.

25 Como se muestra en la FIG. 4, se confirmó que DFD13 tenía una menor cantidad de agregados de alto peso molecular (% de HMW) en la fase inicial y hasta el punto de 2 semanas en comparación con DFD4, lo que indica que la introducción de la mutación EIRP mejora la estabilidad de la proteína de fusión mutante de FGF21, reduciendo de ese modo significativamente el % de HMW.

Ejemplo experimental 2-2. Resultados de estabilidad

30 Para investigar los efectos de la mutación EIRP introducida en la secuencia original LLLLE (98-101) de FGF21 sobre la estabilidad, se midió la estabilidad de DFD4 (SEQ ID NO: 29) y DFD13 (SEQ ID NO: 35) según los métodos descritos en el Ejemplo experimental 2-1. Los resultados del análisis para la muestra de la hora cero (fase inicial; día 0) y las muestras almacenadas durante 4, 8 y 14 días de DFD4 y DFD13 se resumen en la tabla 4 a continuación (en la tabla 4, N.D. significa "no detectado").

35 [Tabla 4]

Estabilidad de DFD4 y DFD13 durante 2 semanas a una concentración de 20 mg/ml (% de HMW)

Día	DFD4			DFD13		
	5 °C	25 °C	37 °C	5 °C	25 °C	37 °C
0	0,91			0,56		
4	4,25	11,64	5,12	0,36	0,34	0,84
8	6,16	9,99	4,87	N.D.	N.D.	N.D.
14	8,15	8,83	4,71	N.D.	N.D.	0,32

40 Como se muestra en la tabla 4, la cantidad de % de HMW en la fase inicial (día 0) fue del 0,91 % para DFD4 y del 0,56 % para DFD13. Después de 2 semanas, la cantidad de % de HMW aumentó hasta el 8,83 % para DFD4, pero no se observó en DFD13, bajo la condición de almacenamiento a 25 °C. Se demostró que DFD13 tenía una tasa de % de HMW menor en la fase inicial y 2 semanas, en comparación con DFD4, lo que indica que la tasa de % de HMW de la proteína de fusión mutante de FGF21 disminuyó significativamente debido a la introducción de la mutación EIRP.

Ejemplo experimental 3. Evaluación farmacocinética de proteínas de fusión

Ejemplo experimental 3-1. Método experimental para la evaluación farmacocinética

5 Ratonos ICR macho de seis semanas adquiridos de Orient BIO (Corea) se dividieron en grupos ($n = 3$ /momento de la toma de muestras de sangre) para que tuvieran valores medios similares de peso corporal un día antes del tratamiento farmacológico, y se les administró por vía subcutánea una vez una muestra respectiva a 1 mg/kg (2 mg/kg para RGE).
 10 Luego se recogieron muestras de sangre a las 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección, respectivamente. La concentración de proteína FGF21 intacta de longitud completa en la sangre se midió usando un kit de ELISA de FGF21 humana intacta (F1231-K01, Eagle Biosciences, EE. UU.), que tiene inmunorreactividad con el extremo N-terminal y C-terminal de la proteína FGF21. Se midieron las concentraciones de las muestras en la sangre recogida hasta 96 horas después de la inyección subcutánea de cada proteína de fusión en los ratones, y se calcularon los parámetros farmacocinéticos de cada muestra.

Ejemplo experimental 3-2. Evaluación de la actividad farmacocinética

15 Basándose en el gráfico que muestra las concentraciones de cada proteína en sangre frente al tiempo tras la administración subcutánea de las proteínas de fusión en ratones (FIG. 5), se calcularon los parámetros farmacocinéticos. Los datos se muestran en la tabla 5 a continuación.

[Tabla 5]

Parámetros	DFD4	DFD5	DFD6	DFD7	DFD9	DFD13	DFD18	DFD72	DFD73	DFD74	Dfd6 (<i>E. coli</i>)	RGE*
Tmáx. (hora)	12	12	12	4	4	12	12	8	8	8	8	12
Cmáx. (ng/ml)	1288	1732	2868	696	384	1070	3428	2962	3296	3996	1399	9921
AUC _{último} (ng·h/ml)	25856	40706	100107	14118	4656	28785	104230	115977	123511	206634	37269	325747
Semivida (hora)	5,5	8,0	14,9	19,7	17,4	7,1	11,0	14,4	16,6	26,0	9,1	12,9

Se comparó y evaluó el perfil farmacocinético de cada proteína de fusión basándose en el valor del área bajo la curva (AUC) que indica el grado de exposición al fármaco.

20 Como se muestra en la tabla 5, al comparar DFD4 con DFD13 y DFD6 con DFD73, se determinó que la introducción de la secuencia EIRP dio como resultado un aumento aproximado del 10 al 20 % en el valor del AUC. Al comparar DFD9 con DFD4, la introducción de TGLEAV dio como resultado un aumento aproximado de 6 veces en el valor del AUC.

25 Además, las mutaciones de TGLEAN, G170N y G174N están diseñadas para extender la semivida al introducir N-glicosilación en el extremo C-terminal de FGF21, que se sabe que se proteoliza *in vivo*. El aumento de AUC debido a la introducción de la N-glicosilación se confirmó comparando los mutantes con cada material de control. Para confirmar el efecto de la mejora de AUC debido a la introducción de la N-glicosilación, el valor de AUC para DFD6 (*E. coli*) producida por *E. coli* que no tiene glicosilación se comparó con el de DFD6 producida por una línea celular humana. DFD6 producida por la línea celular humana mostró un aumento de 3 veces o más en el valor de AUC en comparación con DFD6 (*E. coli*) producida por *E. coli*, que demostró una mejora del perfil farmacocinético debido a la glicosilación.

30 La A180E es una mutación divulgada en el documento WO 2009/149171 propiedad de Amgen Inc. Cuando la mutación de A180E se introdujo además en el mutante DFD13 o DFD73, que incluye la mutación de TGLEAV o G170N, respectivamente, el mutante resultante DFD18 o DFD74, respectivamente, mostró un aumento adicional aproximado de 2 a 3 veces en el valor de AUC.

35 En resumen, se confirmó que los parámetros farmacocinéticos mejoraron mediante la introducción de diversas mutaciones y combinaciones de las mismas, en comparación con DFD9, la proteína de fusión FGF21 de tipo silvestre. La proteína de fusión que mostró el valor de AUC más mejorado fue DFD74 que contenía las mutaciones de EIRP, G170N y A180E, que mostró una mejora aproximada de 45 veces en el valor de AUC en comparación con DFD9. Además, considerando RGE (Amgen) a la dosis de 2 mg/kg de peso corporal, DFD74 puede tener un mayor grado de exposición al fármaco en comparación con RGE. Los efectos globales de la mejora en la farmacocinética debido a las
 40 mutaciones se resumen en la tabla 6 a continuación.

[Tabla 6]

Secuencia de la mutación	Posición de la mutación	Material de control frente a material mejorado	Evaluación de los parámetros farmacocinéticos
EIRP	98-101	DFD4 frente a DFD13	Mejora del AUC
		DFD6 frente a DFD73	
TGLEAV	170-174	DFD9 frente a DFD4	Mejora del AUC
TGLEAN	170-174	DFD9 frente a DFD5	Mejora del AUC
G170N	170	DFD9 frente a DFD6	Mejora del AUC
		DFD6 (<i>E. coli</i>) frente a DFD6	Mejora del AUC
G174N	174	DFD9 frente a DFD7	Mejora del AUC
A180E	180	DFD13 frente a DFD18	Mejora del AUC
		DFD73 frente a DFD74	Mejora del AUC

Ejemplo experimental 4. Evaluación de la actividad de las proteínas de fusión en ratones *ob/ob*

Ejemplo experimental 4-1. Método experimental para evaluar la actividad en ratones *ob/ob*

- 5 Los ratones *ob/ob*, caracterizados por presentar hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperfagia, hígado graso y obesidad debido a una deficiencia genética de leptina, se usan ampliamente para el estudio de la diabetes tipo 2. Se adquirieron ratones *ob/ob* macho (Harlan, EE. UU.) de Raonbio (Corea). Estos ratones tenían de 5 a 6 semanas de edad en el momento de la llegada y de 8 a 9 semanas de edad en el momento del tratamiento farmacológico después de 3 semanas de adaptación. Los ratones se dividieron en grupos ($n = 8/\text{grupo}$) para que tuvieran valores medios similares de peso corporal y niveles de glucosa en sangre caudal un día antes del tratamiento farmacológico (día 0), y las muestras se administraron por vía subcutánea una vez según cada una de sus respectivas dosis. Se administró solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco, EE. UU.) como tratamiento de vehículo y se midió la concentración de glucosa en la sangre usando un medidor de glucosa, GlucoDr (All Medicus, Corea). Los niveles de glucosa sin ayunas y los pesos corporales se midieron todos los días hasta el 14^o día después de la administración. También se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada en cada grupo antes de la administración y después de la prueba. Los niveles de hemoglobina glucosilada se calcularon usando un kit de HbA1c DCA 2000 (Siemens, 5035C).

Ejemplo experimental 4-2. Evaluación de la actividad en ratones *ob/ob*

- 20 Los cambios en los niveles de glucosa en sangre sin ayunas y los pesos corporales en ratones *ob/ob* macho se observaron después de una única inyección subcutánea de 30 o 100 nmol/kg de DFD18 y DFD72, o 10, 30 o 100 nmol/kg de DFD74.

- 25 Se confirmó que DFD18, DFD72 y DFD74 tenían el efecto de reducir el nivel de glucosa en sangre de manera dependiente de la dosis. Al comparar los tres agentes en la dosis alta de 100 nmol/kg, DFD72 y DFD74 mostraron un efecto mejorado sobre la reducción del nivel de glucosa en sangre que DFD18 (FIG. 6). Además, Fc-FGF21 (Lilly), que se usó como material de control en la prueba, fue menos eficaz en la reducción del nivel de glucosa en sangre en comparación con DFD18, DFD72 y DFD74 al mismo nivel de dosis (30 nmol/kg).

En cuanto al efecto sobre la reducción del peso corporal, al comparar los tres agentes en la dosis alta de 100 nmol/kg, DFD72 fue el más eficaz en ratones *ob/ob*, dando como resultado una reducción aproximada del 6 % en el peso corporal, y DFD18 fue el siguiente más eficaz, seguido por DFD74 (FIG. 7).

- 30 Una vez finalizada la prueba, se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada indicativos de los valores medios de glucosa en sangre y se analizaron los cambios en la glucosa en sangre media en cada grupo de prueba. Todos los grupos tratados, excepto el grupo de control tratado con la proteína de control Fc-FGF21 (Lilly), mostraron valores negativos en las diferencias entre antes de la administración y después de la prueba, lo que confirmó la eficacia de las proteínas de prueba en comparación con el material de control en la reducción de la glucosa en sangre (FIG. 8).

Ejemplo experimental 5. Evaluación de la actividad de las proteínas de fusión en ratones HFD/STZ

- 35 Ejemplo experimental 5-1. Método experimental para evaluar la actividad en ratones HFD/STZ

Los efectos de las proteínas de fusión mutantes de FGF21 sobre la reducción de la glucosa en sangre y el peso corporal se compararon y evaluaron en otro modelo diabético, el modelo de ratón HFD/STZ. Los modelos de ratón con obesidad inducida por la dieta convencionales (inducida mediante la alimentación con una dieta rica en grasas del 60 % de kcal a ratones C57BL/6 durante ocho semanas o más) tienen características diabéticas e hiperglucémicas

débiles, aunque provocan resistencia a la insulina. Los ratones HFD/STZ, que pueden compensar los defectos en los modelos de ratón con obesidad inducida por la dieta convencionales, son capaces de producir células β disfuncionales en el páncreas y una disminución de la secreción de insulina como resultado de una dieta rica en grasas (HFD) y la administración de un nivel bajo de estreptozotocina (STZ), y por lo tanto son útiles para estudios farmacológicos de la diabetes tipo 2.

Específicamente, para inducir el modelo de ratón HFD/STZ, se alimentó a ratones C57BL/6 (Japan SLC) con una dieta rica en grasas del 60 % de kcal durante cuatro semanas y, a continuación, se les administró por vía intraperitoneal 50 mg/kg de STZ (Sigma, 85882) todos los días durante 3 días para inducir disfunción en las células β del páncreas. Después de alimentarlos con la dieta rica en grasas durante 2 semanas adicionales, se usaron para la prueba los ratones con niveles de glucosa en sangre sin ayunas de 200 mg/dl o superiores. Los ratones se dividieron en grupos (n=6/grupo) para que tuvieran valores medios similares de peso corporal y niveles de glucosa en sangre caudal un día antes del tratamiento farmacológico (día 0), y las muestras se administraron por vía subcutánea una vez según cada una de sus respectivas dosis. Se administró solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco, EE. UU.) como vehículo de tratamiento y se midió la concentración de glucosa en la sangre usando un medidor de glucosa, GlucoDr (All Medicus, Corea). Los niveles de glucosa sin ayunas y los pesos corporales se midieron todos los días hasta el 14^º día después de la administración. También se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada en cada grupo antes de la administración y después de la prueba. Los niveles de hemoglobina glucosilada se calcularon utilizando un kit de HbA1c DCA 2000 (Siemens, 5035C).

Ejemplo experimental 5-2. Evaluación de la actividad en ratones HFD/STZ

Se observaron los cambios en los niveles de glucosa en sangre sin ayunas y los pesos corporales a lo largo del tiempo en ratones macho HFD/STZ después de una única inyección subcutánea de 10 nmol/kg de DFD72 o DFD74.

En cuanto a los cambios en los niveles de glucosa en sangre sin ayunas, se confirmó que DFD72 y DFD74 tuvieron efectos similares sobre la reducción de los niveles de glucosa en sangre, y el efecto de reducción de la glucosa en sangre se mantuvo hasta el 10^º día después de la administración y luego se perdió con el metabolismo de los medicamentos después del 10^º día (FIG. 9). DFD72 mostró un efecto más prolongado que DFD74 en cuanto a cambios en los niveles de glucosa en sangre sin ayunas después del 10^º día después de la administración.

En cuanto al efecto sobre la reducción del peso corporal debido a la administración de proteínas mutantes de FGF21, se confirmó que tanto DFD72 como DFD74 tuvieron efectos similares sobre la reducción del peso corporal en aproximadamente un 5 %, y el efecto desapareció después del 10^º día después de la administración (FIG. 10).

Una vez finalizado el ensayo, se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada indicativos del valor medio de glucosa en sangre y se analizaron los cambios en la glucosa en sangre media en cada grupo de prueba. Mientras que el grupo del vehículo tuvo un aumento de 0,25 en los niveles de hemoglobina glucosilada, el grupo tratado con DFD74 tuvo un aumento de 0,1 y el grupo tratado con DFD72 tuvo una disminución de 0,27 (FIG. 11).

Ejemplo experimental 6. Actividad de las proteínas de fusión en ratones obesos inducidos por la dieta

Ejemplo experimental 6-1. Método experimental para evaluar actividades en ratones obesos inducidos por la dieta

Se evaluó el efecto de reducción del peso corporal de DFD18, una proteína de fusión mutante de FGF21, en ratones obesos inducidos por la dieta. Para el modelo de obesidad inducida por la dieta, se adquirieron ratones C57BL/6J de Central Lab. Animal Inc. y se alimentaron con una dieta rica en grasas que contenía un 60 % de kcal de grasa (dieta de investigación) durante de 8 a 12 semanas. Los ratones se dividieron en grupos (n = 8/grupo) para que tuvieran un valor medio similar de peso corporal un día antes del tratamiento farmacológico (día 0), y luego se les administró por vía subcutánea 30 nmol/kg de muestras una vez. Los cambios en los pesos corporales se compararon con el grupo tratado con vehículo (PBS).

Ejemplo experimental 6-2. Actividad proteica en ratones obesos inducidos por la dieta

En cuanto a los cambios en el peso corporal a lo largo del tiempo en el modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta después de una única administración de 30 nmol/kg de DFD18, se confirmó que el efecto de reducción del peso continuaba el 10^º día después de la administración, y la reducción máxima de peso (aproximadamente un 18 %) fue el 11^º día después de la administración, que se mantuvo el 14^º día (FIG. 12).

Ejemplo de preparación 2. Preparación y purificación de proteínas de doble función

Ejemplo de preparación 2-1. Preparación de vectores de expresión para la expresión de proteínas de doble función

Con el fin de identificar los efectos de la secuencia de la proteína mutante de GLP-1 y la secuencia de la bisagra Fc fusionada a la misma sobre la actividad *in vitro*, los perfiles farmacocinéticos y la eficacia farmacológica, se diseñaron diversas secuencias para las proteínas mutantes de GLP-1 fusionadas a Fc. Las secuencias de las proteínas mutantes de GLP-1 se enumeran en la tabla 7 a continuación, y las secuencias de los mutantes de GLP-1 fusionados a Fc se enumeran en la tabla 8.

[Tabla 7]

SEQ ID NO	Secuencia de la proteína mutante de GLP-1
43	GLP-1(A2G)
44	GLP-1(GE)
45	GLP-1(GG)
46	GLP-1(GEG)

[Tabla 8]

SEQ ID NO	Proteína mutante de GLP-1 fusionada a Fc
49	DFD52: GLP1(A2G)-HyFc5
50	DFD53: GLP1(A2G)-HyFc40
51	DFD54: GLP1(GE)-HyFc5
52	DFD55: GLP1(GE)-HyFc40
53	DFD56: GLP1(GG)-HyFc5
54	DFD57: GLP1(GG)-HyFc40
55	DFD58: GLP1(GEG)-HyFc5
56	DFD59: GLP1(GEG)-HyFc40

5 En la tabla 8, HyFc5 se refiere a SEQ ID NO: 47 y HyFc40 se refiere a SEQ ID NO: 48.

10 Para investigar los efectos de las secuencias de las proteínas mutantes de GLP-1 y las proteínas mutantes de FGF21, la secuencia de la bisagra Fc fusionada a los mutantes de GLP-1, la secuencia del enlazador conectado entre las proteínas mutantes de FGF21 y Fc sobre la actividad *in vitro*, los perfiles farmacocinéticos y la eficacia farmacológica, se diseñaron diversas secuencias para las proteínas de doble función. Las secuencias de las proteínas de doble función, incluidas las proteínas mutantes de GLP-1 y las proteínas mutantes de FGF21, se enumeran en la tabla 9 a continuación. Cada proteína de doble función contiene una proteína mutante de GLP-1, una región Fc de una inmunoglobulina, un enlazador y una proteína mutante de FGF21 conectados en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

[Tabla 9]

SEQ ID NO	Código de material	Secuencia de la proteína mutante de GLP-1	Portador de fusión	Secuencia de enlazador	Cambios en la secuencia de FGF21
58	DFD23	GLP-1(A2G)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
59	DFD24	GLP-1(GE)	hyFc5 (SEQ ID NO: 47)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
60	DFD25	GLP-1(GE)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
61	DFD26	GLP-1(GG)	hyFc5 (SEQ ID NO: 47)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
62	DFD27	GLP-1(GG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
63	DFD28	GLP-1(GEG)	hyFc5 (SEQ ID NO: 47)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
64	DFD29	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
65	DFD69	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV, A180E)
66	DFD112	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV, A180E)

SEQ ID NO	Código de material	Secuencia de la proteína mutante de GLP-1	Portador de fusión	Secuencia de enlazador	Cambios en la secuencia de FGF21
67	DFD114	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 48)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, G170N, A180E)

5 Específicamente, las secuencias de nucleótidos que codifican cada una de las proteínas de doble función se sintetizaron después de consultar con Bioneer Corporation (Corea) basándose en la secuencia de aminoácidos de cada proteína. Se añadieron las secuencias de enzimas de restricción *NheI* y *NotI* a los extremos 5' y 3' de las secuencias de nucleótidos que codifican cada una de las proteínas de doble función y se insertaron un codón de iniciación para la traducción de proteínas y una secuencia líder (MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPSHA) que permite la secreción de la proteína expresada al exterior de una célula junto a la secuencia de enzimas de restricción en el extremo 5'. Se insertó un codón de terminación junto a la secuencia de nucleótidos que codifica cada una de las proteínas de doble función. La secuencia de nucleótidos que codifica cada una de las proteínas de doble función se clonó en un vector de expresión pTrans-empty usando las dos enzimas de restricción *NheI* y *NotI*. El vector de expresión pTrans-empty, que tiene una estructura simple que incluye un promotor de CMV, un origen de replicación derivado de pUC, un origen de replicación derivado de SV40 y un gen de resistencia a la ampicilina, se adquirió de CEVEC Pharmaceuticals (Alemania).

15 Ejemplo de preparación 2-2. Construcción de ADN plasmídico para la expresión de mutantes de GLP-1 fusionados a Fc y proteínas de doble función

Se transformó *E. coli* con cada uno de los vectores de expresión construidos en el Ejemplo de preparación 2-1 para obtener una gran cantidad de ADN plasmídico que va a usarse para la expresión. Se transformaron células de *E. coli*, con paredes celulares debilitadas por choque térmico, con cada vector de expresión y los transformantes se sembraron en una placa LB para obtener colonias. Las colonias así obtenidas se inocularon en medio LB, se cultivaron a 37 °C durante 16 horas y se obtuvo cada cultivo de *E. coli* que contenía cada vector de expresión en un volumen de 100 ml. La *E. coli* obtenida posteriormente se centrifugó para eliminar el medio de cultivo y luego se añadieron soluciones P1, P2, P3 (QIAGEN, n.º de cat.: 12963) para romper las paredes celulares, obteniendo de ese modo una suspensión de ADN en la que las proteínas y el ADN estaban separados. El ADN plasmídico se purificó de la suspensión de ADN así obtenida usando una columna de purificación de ADN de Qiagen. El ADN plasmídico eluido se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa y las concentraciones y purezas se midieron usando un dispositivo Nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop Lite). El ADN así obtenido se usó para la expresión.

Ejemplo de preparación 2-3. Expresión de mutantes de GLP-1 fusionados a Fc y proteínas de doble función en células CAP-T

30 Se transformaron líneas celulares humanas con cada ADN plasmídico obtenido en el Ejemplo de preparación 2-2. Cada tipo de ADN plasmídico se transdujo en células CAP-T (CEVEC), que se habían cultivado en medio PEM (Life Technologies), usando una solución de PEI (Polyplus, n.º de cat.: 101-10N). La solución mixta de ADN y la solución de PEI se mezcló con la suspensión celular usando medio de expresión Freestyle293 (Invitrogen), se cultivó a 37 °C durante 5 horas y se añadió medio PEM. Después de cultivar a 37 °C durante 5-7 días, el cultivo se centrifugó para eliminar las células y se obtuvo el sobrenadante que contenía cada proteína.

35 Ejemplo de preparación 2-4. Purificación de mutantes de GLP-1 fusionados a Fc y proteínas de doble función

La columna de cromatografía de afinidad de proteína A (GE Healthcare) se equilibró con una solución tampón de PBS 1X (pH 7,4). El sobrenadante de cultivo que incluía cada uno de los mutantes de GLP-1 fusionados a Fc y las proteínas de doble función obtenidos en el Ejemplo de preparación 2-3 se filtró con un filtro de 0,2 µm y luego se cargó en una columna de cromatografía de afinidad de proteína A. La columna se lavó con una solución tampón de PBS 1X (pH 7,4) y luego las proteínas se eluyeron usando una solución tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Las proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad se purificaron usando una columna de resina de intercambio aniónico (POROS® HQ 50 µm, Thermo Fisher Scientific). La columna de resina de intercambio aniónico se equilibró con una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0), antes de cargar en la misma las proteínas eluidas de la cromatografía de afinidad.

45 Después de lavar la columna con una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0), se dispensó una solución tampón de Tris 50 mM (pH 8,0) a lo largo del gradiente de concentración y se analizaron las fracciones eluidas. Cada fracción eluida se analizó usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC), y las fracciones que incluían los mutantes de GLP-1 fusionados a Fc y las proteínas de doble función con alta pureza se recogieron y se dializaron durante la noche a 4 °C usando una solución tampón final (PBS 1X, EDTA 1 mM, pH 7,4). Una vez completada la diálisis, la solución madre de proteína obtenida se concentró a 3000 rpm usando un filtro de centrifugación de corte de 30000 MW a 4 °C. La concentración de cada proteína se midió mediante análisis cuantitativo BCA.

50

Ejemplo experimental 7. Actividad *in vitro* de las proteínas de doble función

Ejemplo experimental 7-1. Actividad de DFD23, DFD24, DFD25, DFD26, DFD27, DFD28 y DFD29

Se midieron las actividades *in vitro* de GLP-1 de las proteínas de doble función DFD23, DFD24, DFD25, DFD26, DFD27, DFD28 y DFD29. Específicamente, se adquirió una línea celular CHO (Eurofins, HTS163C2), que sobreexpresaba el receptor de GLP-1 humano y se usó para evaluar las actividades de GLP-1 de las proteínas de doble función. Para la evaluación de la actividad, las muestras que contenían las proteínas de fusión (soluciones madre de proteína preparadas en el Ejemplo de preparación 2-4; a continuación en el presente documento, "muestra") se sometieron a una dilución en serie de 4 veces a una concentración de 25 nM. Después de tratar la línea celular CHO que sobreexpresaba el receptor de GLP-1 humano durante 30 minutos, se midió el AMPc intracelular producido (Cisbio, 62AM4PEB). La actividad de cada proteína se evaluó comparando los valores de CE₅₀.

Como se muestra en la FIG. 13, la proteína de doble función que contiene la secuencia de GLP-1 (A2G) mostró una actividad aproximadamente 2-3 veces menor que la de las proteínas de doble función que contienen otras secuencias mutantes de GLP-1. No se observó ninguna diferencia significativa en las actividades de GLP-1 entre las proteínas de doble función que contienen las secuencias de mutación, excepto la secuencia de GLP-1 (A2G).

Ejemplo experimental 7-2. Actividades de DFD59, DFD69, DFD112 y DFD114

Se midieron las actividades *in vitro* de GLP-1 de las proteínas de doble función DFD69, DFD112 y DFD114 preparadas en el Ejemplo de preparación 2 y DFD59 (un mutante de GLP-1 fusionado a Fc). Específicamente, se adquirió una línea celular CHO (Eurofins, HTS163C2) que sobreexpresaba el receptor de GLP-1 humano y se usó para evaluar las actividades de GLP-1 de las proteínas de doble función. Para la evaluación de la actividad, la muestra que contenía cada una de las proteínas de fusión se sometió a una dilución en serie de 4 veces a una concentración de 25 nM. Después de tratar la línea celular CHO que sobreexpresaba el receptor de GLP-1 humano durante 30 minutos, se midió el AMPc intracelular producido (Cisbio, 62AM4PEB).

Como se muestra en la FIG. 14, la actividad de cada proteína se evaluó comparando el valor de CE₅₀. Las tres proteínas de doble función mostraron valores de CE₅₀ similares, y DFD59 (que no contiene ningún mutante de FGF21) mostró una actividad aproximadamente 2 veces mayor que la de las proteínas de doble función.

A continuación, se midieron las actividades *in vitro* de la porción de FGF21 en DFD69, DFD112 y DFD114. Específicamente, se evaluaron las actividades *in vitro* de la porción de FGF21 en las proteínas de doble función usando una línea celular HEK293 que sobreexpresaba β-klotho humano (un correceptor de FGF21). Para la evaluación de la actividad, las muestras que contenían cada una de las proteínas de doble función se sometieron a una dilución en serie de 3 veces a una concentración de 3 μM. Después de haberse cultivado en un estado deficiente en suero durante 5 horas, la línea celular HEK293 que sobreexpresaba β-klotho humano se trató durante 20 minutos, antes de que las células se lisaran añadiendo tampón de citólisis (Cisbio/n.⁹ de cat. 64ERKPEG) con agitación a 60 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lisado celular se mezcló con anticuerpos que pueden detectar ERK y ERK fosforilada, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. La fluorescencia se detectó usando un detector fluorométrico (TECAN/GENiosPro). Las actividades se midieron comparando sus valores de CE₅₀.

Se confirmó que las actividades *in vitro* de la porción de FGF21 de las proteínas de doble función DFD69, DFD112 y DFD114 fueron similares, como se muestra en la FIG. 14.

Ejemplo experimental 8. Evaluación farmacocinética de proteínas de doble función

Ejemplo experimental 8-1. Método experimental para la evaluación farmacocinética

Ratones ICR macho de seis semanas adquiridos de Orient BIO (Corea) se dividieron en grupos ($n = 3$ /momento de la toma de muestras de sangre) para que tuvieran un valor medio similar de peso corporal un día antes del tratamiento farmacológico, y se les administró por vía subcutánea una vez una muestra respectiva en un volumen de 1 mg/kg. Las muestras de sangre se recogieron a las 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192 y 240 horas después de la inyección, respectivamente. La concentración de cada proteína de doble función en la sangre se midió basándose en la porción de FGF21 y la porción de GLP-1-Fc por separado. La concentración de la porción de FGF21 de longitud completa intacta de la proteína de doble función en la sangre se midió usando un kit de ELISA de FGF21 humana intacta (F1231-K01, Eagle Biosciences, EE. UU.), que tiene inmunorreactividad con el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la proteína FGF21. Además, se midió la concentración de la porción de GLP-1-Fc activa de la proteína de doble función en la sangre usando un anticuerpo, que tiene inmunorreactividad con el extremo N-terminal de GLP-1 y Fc, como se determinó mediante análisis de ELISA. Se midieron las concentraciones de las porciones de FGF21 y GLP-1-Fc de cada proteína en las muestras de sangre recogidas hasta 240 horas después de una única inyección subcutánea de cada proteína en los ratones, y se calcularon los parámetros farmacocinéticos de cada proteína.

Ejemplo experimental 8-2. Resultados de la actividad farmacocinética

Basándose en la concentración de cada sustancia activa en la sangre a lo largo del tiempo después de una única administración subcutánea de cada proteína en ratones (FIG. 15), se calcularon los parámetros farmacocinéticos para

las porciones de FGF21 y GLP-1-Fc de las proteínas de doble función. Los datos se muestran en la tabla 10 a continuación.

[Tabla 10]

Parámetro	Detección de FGF21			Detección de GLP-1-Fc			
	DFD69	DFD112	DFD114	DFD59	DFD69	DFD112	DFD114
T _{máx.} (hora)	8	8	24	4	4	8	4
C _{máx.} (ng/ml)	2715	3619	3711	5202,1	3234	4454	3616
AUC _{último} (ng·h/ml)	100907	144395	222504	182852	149083	189338	171687
Semivida (hora)	13,4	14,2	39,9	20,7	23,3	24,7	27,2

- 5 Se compararon y evaluaron los perfiles farmacocinéticos de cada proteína de doble función basándose en el valor del área bajo la curva (AUC), que indica el grado de exposición al fármaco.

10 Como se muestra en la tabla 10, para los parámetros farmacocinéticos de la porción de FGF21, DFD114 mostró el mayor grado de exposición al fármaco (AUC) y semivida, y DFD112 mostró el siguiente valor de AUC más alto, seguido de DFD69. DFD114 presentó un aumento aproximado de 2 veces o más en el valor de AUC en comparación con DFD69. Para la farmacocinética de la porción de GLP-1-Fc, las cuatro proteínas (DFD59, DFD69, DFD112 y DFD114) que contienen la misma secuencia mutante de GLP-1 mostraron valores de AUC similares.

Ejemplo experimental 9. Evaluación de la actividad en ratones *db/db*

Ejemplo experimental 9-1. Método para evaluar actividades en ratones *db/db*

15 Los ratones *db/db*, caracterizados por tener hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperfagia, hígado graso y obesidad debido a una deficiencia genética del receptor de leptina y que presentan hiperglucemia y obesidad más graves que los ratones *ob/ob*, se usan ampliamente para el estudio de la diabetes tipo 2. Se adquirieron ratones macho *db/db* (Harlan, EE. UU.) de Raonbio (Corea). Estos ratones tenían de 5 a 6 semanas de edad en el momento de la llegada y de 8 a 9 semanas en el momento del tratamiento farmacológico, después de 3 semanas de adaptación. Los ratones se dividieron en grupos (n = 6/grupo) para que tuvieran un valor medio similar de peso corporal y niveles de glucosa en sangre caudal un día antes del tratamiento farmacológico (día 0), y las muestras se administraron por vía subcutánea una vez según cada una de sus respectivas dosis. Se administró solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco, EE. UU.) como tratamiento de vehículo y se midió la concentración de glucosa en la sangre usando un medidor de glucosa, GlucoDr (All Medicus, Corea). Los niveles de glucosa sin ayunas y los pesos corporales se midieron todos los días hasta el 14^º día después de la administración. También se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada en cada grupo antes de la administración y después de la prueba. Los niveles de hemoglobina glucosilada se calcularon usando un kit de HbA1c DCA 2000 (Siemens, 5035C).

Ejemplo experimental 9-2. Evaluación de la actividad en ratones *db/db*

30 Los cambios en los niveles de glucosa en sangre sin ayunas y los pesos corporales en ratones *db/db* macho se observaron después de una única inyección subcutánea de 10 o 30 nmol/kg de proteína de doble función DFD114, una única inyección subcutánea de 30 nmol/kg de proteína de función única GLP-1-Fc de acción prolongada DFD59 y la administración combinada de 30 nmol/kg de DFD59 y DFD74 (que son proteínas de función única GLP-1-Fc y Fc-FGF21, respectivamente) para comparar el efecto de la proteína de doble función DFD114 con la administración combinada de proteínas de función única Fc-FGF21 y GLP-1-Fc.

35 La proteína GLP-1-Fc de acción prolongada DFD59 provocó una reducción brusca de los niveles de glucosa en sangre el 1^{er} día después de la administración, pero la reducción de la glucosa en sangre disminuyó después del 2^º día y el nivel de glucosa en sangre fue similar al del grupo tratado con vehículo después del 4^º día. Mientras tanto, el grupo tratado con DFD114 mostró excelentes efectos sobre la reducción de la glucosa en sangre el 3^{er} día después de la administración, y los efectos sobre la reducción del nivel de glucosa en sangre desaparecieron más rápidamente después del 4^º día a partir de la administración de la dosis de 10 nmol/kg que para la de 30 nmol/kg, lo que indica diferencias dependientes de la dosis en la duración del efecto reductor de la glucosa en sangre. Los grupos tratados con la administración combinada de cada proteína mostraron los efectos más sostenidos para reducir los niveles de glucosa en sangre en comparación con los de los otros grupos, lo que indica que la combinación de GLP-1 y FGF21 tuvo un efecto excelente sobre el control del nivel de glucosa en sangre (FIG. 16).

45 En cuanto al efecto sobre la reducción del peso corporal, los grupos tratados con una combinación de DFD59 y DFD74 mostraron los mayores efectos sobre la reducción del peso corporal, y el grupo tratado con 30 nmol/kg de DFD114 también mostró un efecto excepcional sobre la reducción del peso corporal (FIG. 17).

Después de la terminación de las pruebas, se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada indicativos del valor

medio de glucosa en sangre y se analizaron los cambios en la glucosa en sangre media en cada grupo de prueba. Como se muestra en la FIG. 18, el grupo tratado con vehículo mostró niveles de hemoglobina glucosilada aumentados después de la terminación de las pruebas en comparación con el grupo antes de la administración, y el grupo tratado con DFD59 mostró un aumento similar. El grupo tratado con 30 nmol/kg de DFD114 mostró la mayor disminución en los niveles de hemoglobina glucosilada, y el grupo que recibió la administración combinada mostró la siguiente mayor eficacia, seguido por el grupo tratado con 10 nmol/kg de DFD114. Al evaluar las proteínas comparándolas basándose en la disminución en los niveles de hemoglobina glucosilada en cada grupo tratado, se confirmó que la proteína de doble función DFD114 mostró un efecto más fuerte sobre la reducción del nivel de glucosa en sangre que la proteína de función única GLP-1-Fc o Fc-FGF21 sola.

5
10 Ejemplo experimental 10. Actividad de las proteínas de fusión en ratones HFD/STZ

Ejemplo experimental 10-1. Método experimental para evaluar actividades en ratones HFD/STZ

Se compararon y evaluaron los efectos de las proteínas de doble función sobre la reducción de la glucosa en sangre y el peso corporal en otro modelo diabético, el modelo de ratón HFD/STZ.

15 El modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta convencional (inducida mediante la alimentación de ratones C57BL/6 con una dieta rica en grasas del 60 % de kcal durante ocho semanas o más) tiene características diabéticas e hiperglucémicas débiles, aunque provoca resistencia a la insulina. Los ratones HFD/STZ, que pueden compensar las deficiencias del modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta convencional, son capaces de generar células β disfuncionales del páncreas y una disminución de la secreción de insulina después de una dieta rica en grasas (HFD) y la administración de un nivel bajo de estreptozotocina (STZ), y se usan para estudios farmacológicos de diabetes tipo 2. Para inducir el modelo de ratón HFD/STZ, se alimentó a ratones C57BL/6 con una dieta rica en grasas del 60 % de kcal durante cuatro semanas, y luego se les administró 50 mg/kg de STZ (Sigma, 85882) por vía intraperitoneal todos los días durante 3 días para inducir la disfunción de las células β del páncreas. Después de alimentarse con la dieta alta en grasas durante 2 semanas adicionales, se seleccionaron para la prueba los ratones con niveles de glucosa en sangre sin ayunas de 200 mg/dl o más. Los ratones se dividieron en grupos (n=6/grupo) para que tuvieran un valor medio similar de peso corporal y niveles de glucosa en sangre caudal un día antes del tratamiento farmacológico (día 0), y las muestras se administraron por vía subcutánea una vez según cada una de sus respectivas dosis. Se administró solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco, EE. UU.) como tratamiento de vehículo, y la concentración de glucosa en la sangre se midió usando un medidor de glucosa, GlucoDr (All Medicus, Corea). Los niveles de glucosa sin ayunas y los pesos corporales se midieron todos los días hasta el día 14^o día después de la administración. También se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada en cada grupo antes de la administración y después de la prueba. Los niveles de hemoglobina glucosilada se calcularon usando un kit de HbA1c DCA 2000 (Siemens, 5035C).

20
25
30

Ejemplo experimental 10-2. Actividad en ratones HFD/STZ

35 Los cambios en los niveles de glucosa en sangre sin ayunas y los pesos corporales a lo largo del tiempo en ratones macho HFD/STZ se observaron después de una única inyección subcutánea de 3 nmol/kg o 10 nmol/kg de la proteína de doble función DFD114, 10 nmol/kg del mutante de GLP-1 fusionado a Fc DFD59, o 10 nmol/kg de cada uno de los mutantes de FGF21 fusionados a Fc DFD72 y DFD74. DFD59 y DFD74 también se inyectaron por vía subcutánea una vez a 10 nmol/kg cada uno para comparar el efecto de la administración combinada de las proteínas de función única con el de la proteína de doble función.

40 Como se muestra en la FIG. 19, con respecto a los cambios en los niveles de glucosa en sangre hasta el 4^o día, la administración de DFD72 y DFD74 (proteínas de función única FGF21 de acción prolongada) dio como resultado reducciones más lentas de la glucosa en sangre, mientras que DFD114 (proteína de acción prolongada que incluye GLP-1), DFD59 y la administración combinada de DFD59 y DFD74 mostraron una reducción más rápida de la glucosa en sangre desde el 1^{er} día de administración. Similares a los resultados en ratones *db/db*, DFD59 mostró una reducción brusca de la glucosa en sangre en una fase temprana, pero la reducción de la glucosa en sangre desapareció lentamente después del 4^o día. DFD114 mostró un patrón similar en la dosis baja de 3 nmol/kg. En los grupos tratados con 10 nmol/kg de DFD114, DFD72, DFD74 y administración combinada, se observaron perfiles de glucosa en sangre sin ayunas similares.

45

50 En cuanto al efecto sobre la reducción del peso corporal, el grupo tratado con la administración combinada de DFD59 y DFD74 mostró el mayor efecto sobre la reducción del peso corporal (del 7 al 8 %), y el grupo tratado con 10 nmol/kg de DFD114 también mostró un efecto excepcional sobre la reducción del peso corporal (aproximadamente el 6 %) (FIG. 20). El grupo tratado con DFD59 presentó una reducción del peso corporal del 5 % el 1^{er} día después de la administración, pero el efecto desapareció después del 2^o día y se volvió similar al del grupo de vehículo después del 7^o día. El grupo tratado con cada una de las proteínas de función única FGF21 de acción prolongada DFD72 y DFD74 mostró una reducción más lenta del peso corporal en del 4 al 5 % hasta el 7^o día después de la administración, y el efecto desapareció después del 10^o día.

55

Después de la terminación de las pruebas, se midieron los niveles de hemoglobina glucosilada indicativos del valor medio de glucosa en sangre y se analizaron los cambios en la glucosa en sangre media en cada grupo de prueba

- (FIG. 21). El grupo del vehículo tuvo un aumento en los niveles de hemoglobina glucosilada después de la terminación de la prueba en comparación con antes de la administración, y el grupo tratado con DFD59 mostró un aumento similar. Por el contrario, el grupo tratado con DFD114 mostró reducciones en los niveles de hemoglobina glucosilada de una manera dependiente de la dosis, y el grupo tratado con 10 nmol/kg de DFD114 tuvo el mayor efecto en cuanto a niveles reducidos de hemoglobina glucosilada (-0,42 %). El grupo tratado con la administración combinada de DFD59 y DFD74 mostró niveles reducidos de hemoglobina glucosilada (-0,38 %) similares a los de DFD114. Para las proteínas de función única FGF21 de acción prolongada, se observó que DFD72 fue superior a DFD74. Al comparar las proteínas basándose en los niveles reducidos de hemoglobina glucosilada en cada grupo, se confirmó que la proteína de doble función DFD114 fue superior a las proteínas de función única GLP-1-Fc y Fc-FGF21.
- 5
- 10 Ejemplo experimental 11. Predicción y evaluación de la inmunogenicidad
- Ejemplo experimental 11-1. Método de predicción de la inmunogenicidad y resultados
- Para predecir la inmunogenicidad potencial de las proteínas de doble función, se realizó un análisis *in silico* de la inmunogenicidad para cada proteína.
- 15 Específicamente, se examinó rápidamente la inmunogenicidad potencial de las proteínas de doble función usando los métodos iTope™ y TCED™ (Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools, BioDrugs, 2010). Según los dos métodos, el epítipo de células T puede predecirse con mayor precisión en comparación con el método analítico *in silico* que depende únicamente del análisis de unión de MHC de clase II.
- Ejemplo experimental 11-2. Método de evaluación *ex vivo* de la inmunogenicidad y resultados
- 20 Para evaluar la inmunogenicidad potencial de las proteínas de doble función, se realizó un análisis EpiScreen™ (Increased brain bio-distribution and chemical stability and decreased immunogenicity of an engineered variant of GDNF, Exp Neurol, 2015). Cuando se detecta inmunogenicidad, las secuencias de aminoácidos que inducen inmunogenicidad pueden identificarse a través del mapeo de epítopos de células T, y pueden diseñarse y prepararse mutantes desinmunizados con inmunogenicidad minimizada por medio de predicción *in silico* para reevaluar la inmunogenicidad.
- 25

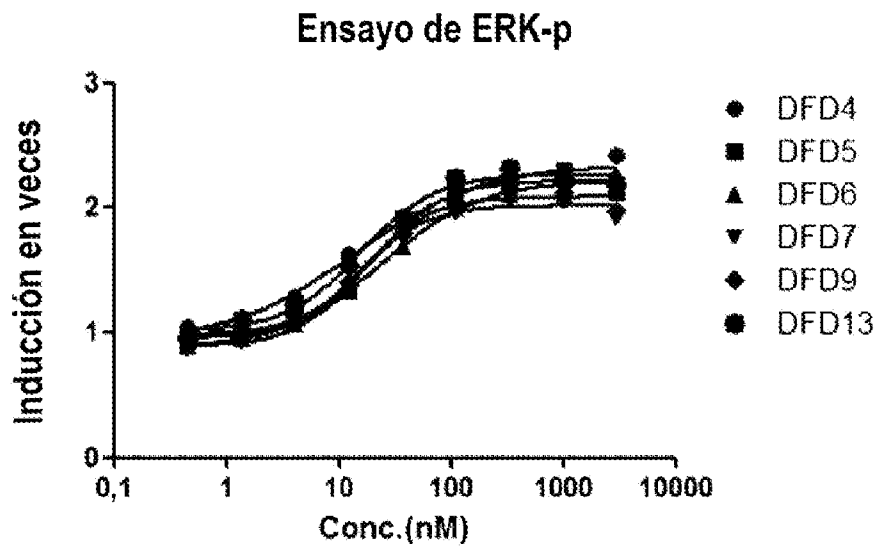
REIVINDICACIONES

1. Una proteína de doble función que comprende una proteína mutante del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21); una proteína biológicamente activa; y una región Fc de una inmunoglobulina,
5 en donde la proteína mutante de FGF21 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 11 a 15 y 20 a 23;

 en donde la proteína biológicamente activa es una seleccionada del grupo que consiste en péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), un mutante de GLP-1 y exendina-4, en donde el mutante de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 43 a 46; y

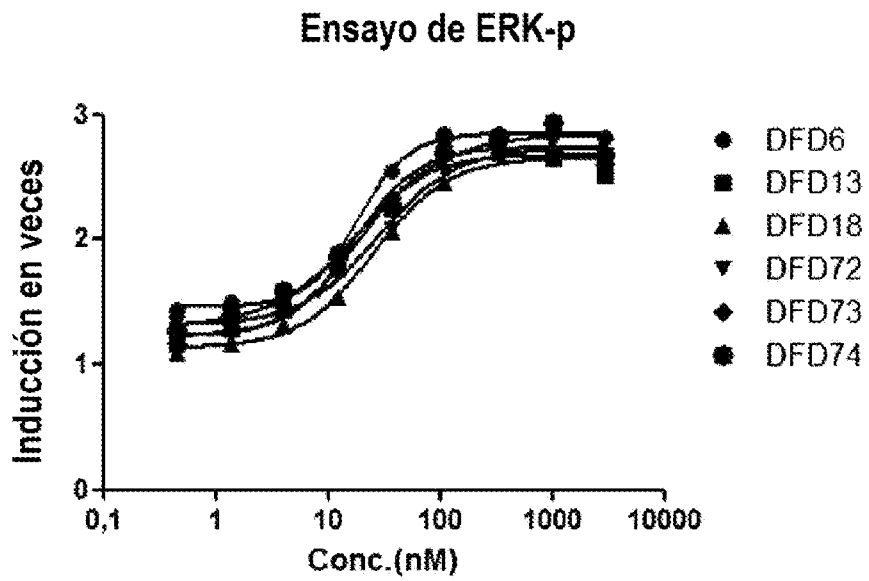
10 en donde la proteína de doble función comprende además un enlazador, en donde el enlazador conecta la proteína mutante de FGF21 a la región Fc de la inmunoglobulina.
2. La proteína de doble función según la reivindicación 1, en donde un residuo de aminoácido N de la proteína mutante de FGF21 introducido por una mutación está glicosilado.
3. La proteína de doble función según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína biológicamente activa es GLP-1 o un mutante de GLP-1, en donde el mutante de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 43 a 46.
15
4. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el enlazador está conectado al extremo C-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina y al extremo N-terminal de la proteína mutante de FGF21.
5. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la región Fc de la inmunoglobulina es una cualquiera de las regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgD, o un Fc híbrido que contiene una combinación de las mismas, preferiblemente en donde el Fc híbrido comprende una región de IgG4 y una región de IgD.
20
6. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de doble función comprende la proteína biológicamente activa, la región Fc de la inmunoglobulina y la proteína mutante de FGF21, conectadas en este orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.
25
7. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el enlazador es un péptido que consiste en de 10 a 30 residuos de aminoácidos.
8. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 5.
9. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la proteína de doble función tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67.
30
10. La proteína de doble función según la reivindicación 9, en donde la proteína de doble función tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.
11. La proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares.
35
12. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedades cardiovasculares.
13. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de doble función según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
40
14. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.

[Fig. 1a]



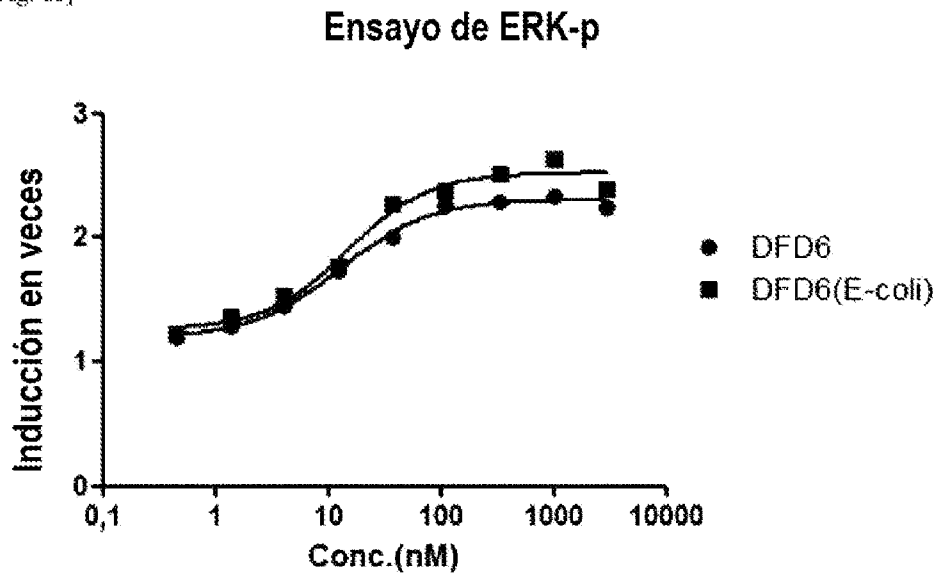
	CE_{50} (nM)
DFD4	13,97
DFD5	20,19
DFD6	23,73
DFD7	14,73
DFD9	17,13
DFD13	15,31

[Fig. 1b]



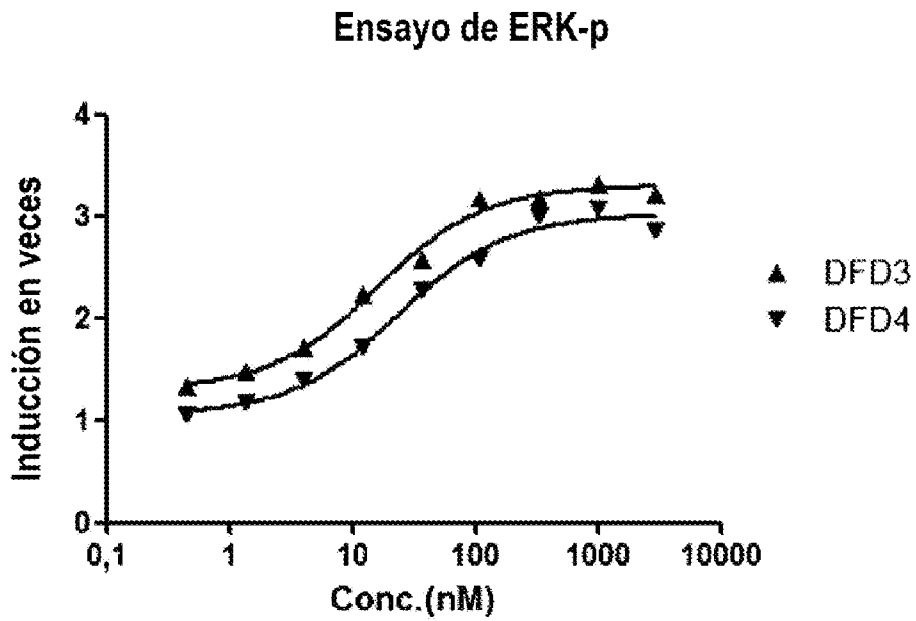
	CE ₅₀ (nM)
DFD6	18,41
DFD13	17,28
DFD18	25,52
DFD72	28,13
DFD73	16,96
DFD74	19,45

[Fig. 1c]



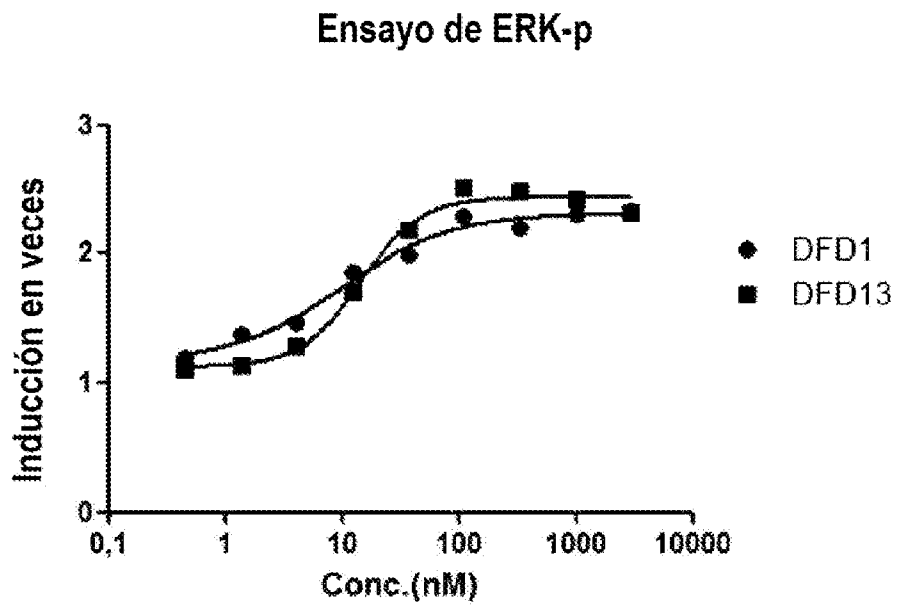
	CE ₅₀ (nM)
DFD6	12,61
DFD6(E-coli)	14,49

[Fig. 2a]



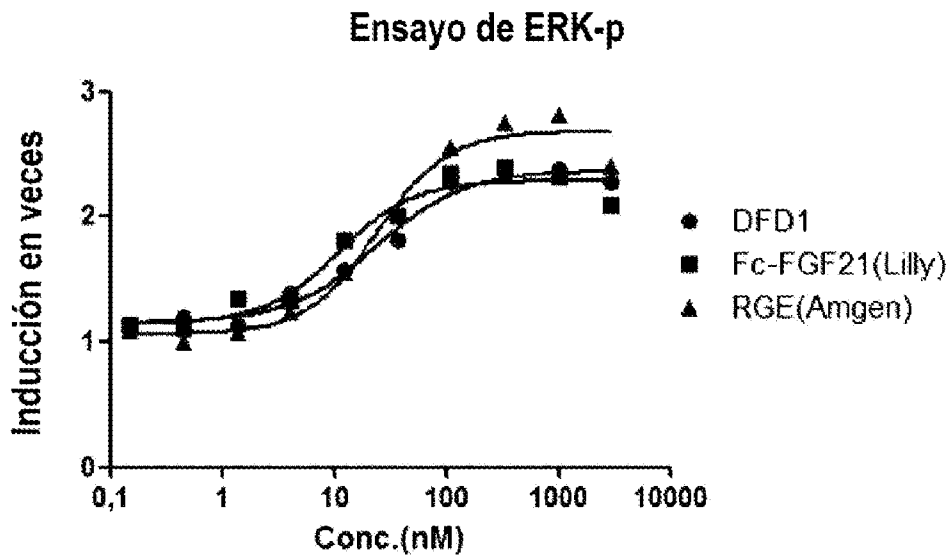
	CE ₅₀ (nM)
DFD3	15,69
DFD4	23,37

[Fig. 2b]



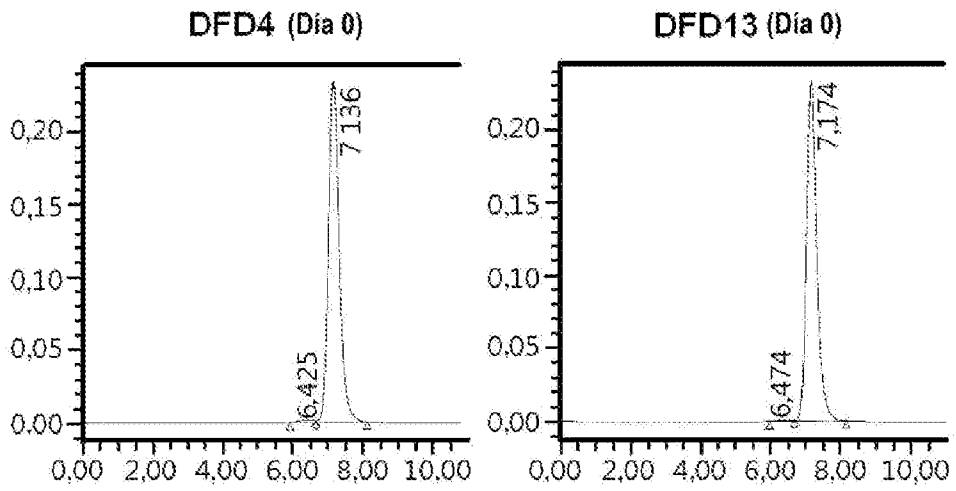
	CE ₅₀ (nM)
DFD1	9,77
DFD13	14,18

[Fig. 3]



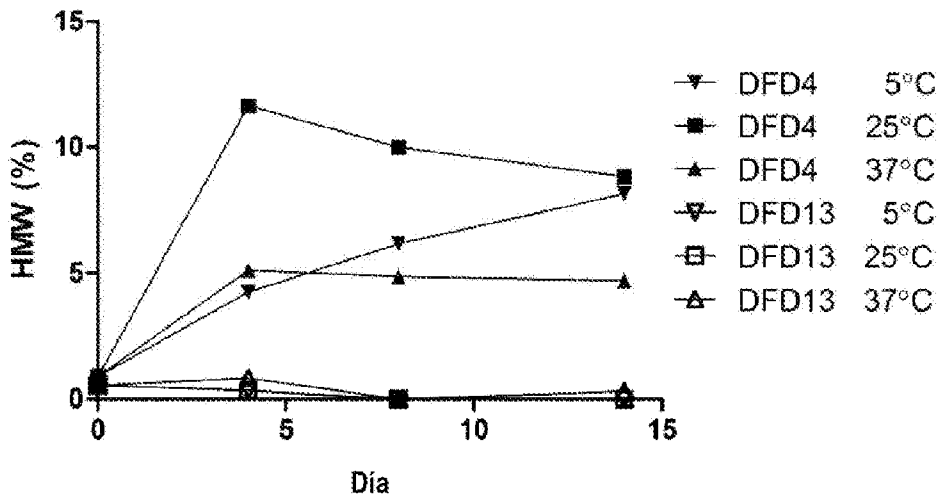
	CE ₅₀ (nM)
DFD1	23,44
Fc-FGF21(Lilly)	10,95
RGE(Amgen)	23,81

[Fig. 4]



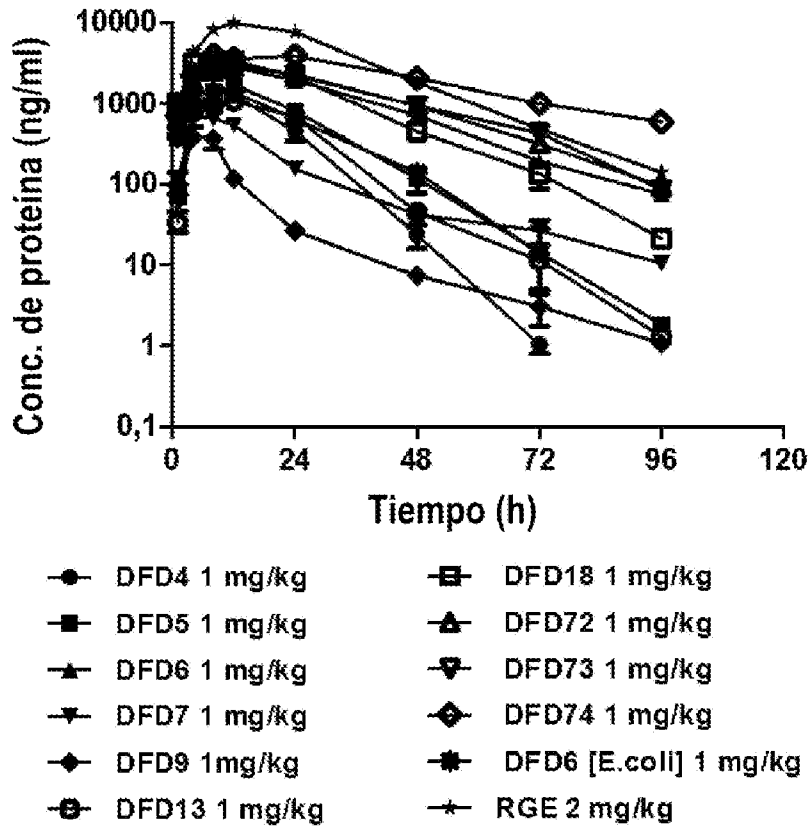
	TR	Área	% de área	Altura
1	6,425	46359	0,93	1520
2	7,136	4940917	99,07	234651

	TR	Área	% de área	Altura
1	6,474	28735	0,60	984
2	7,174	4789139	99,40	232719

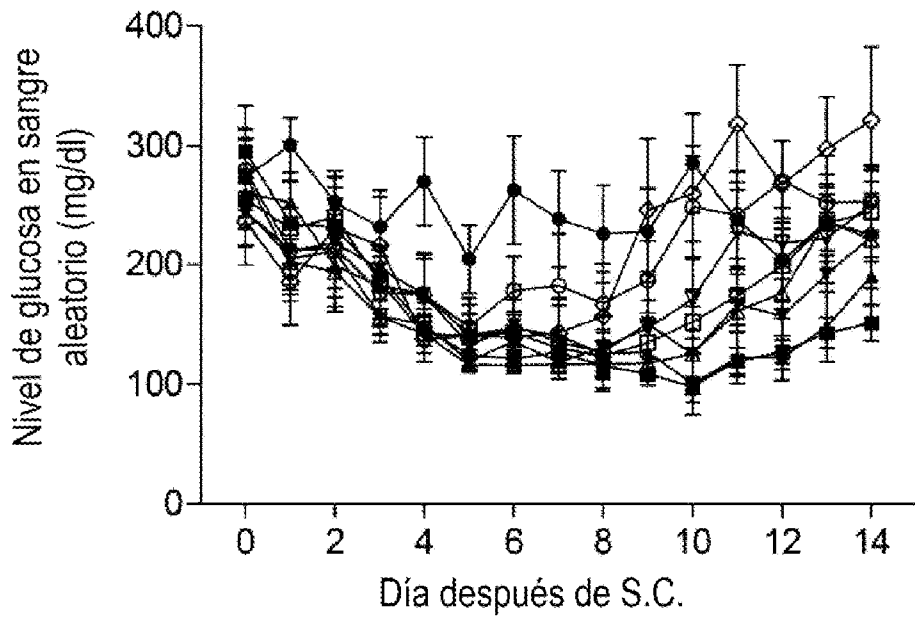


[Fig. 5]

PK mediante detección de FGF21

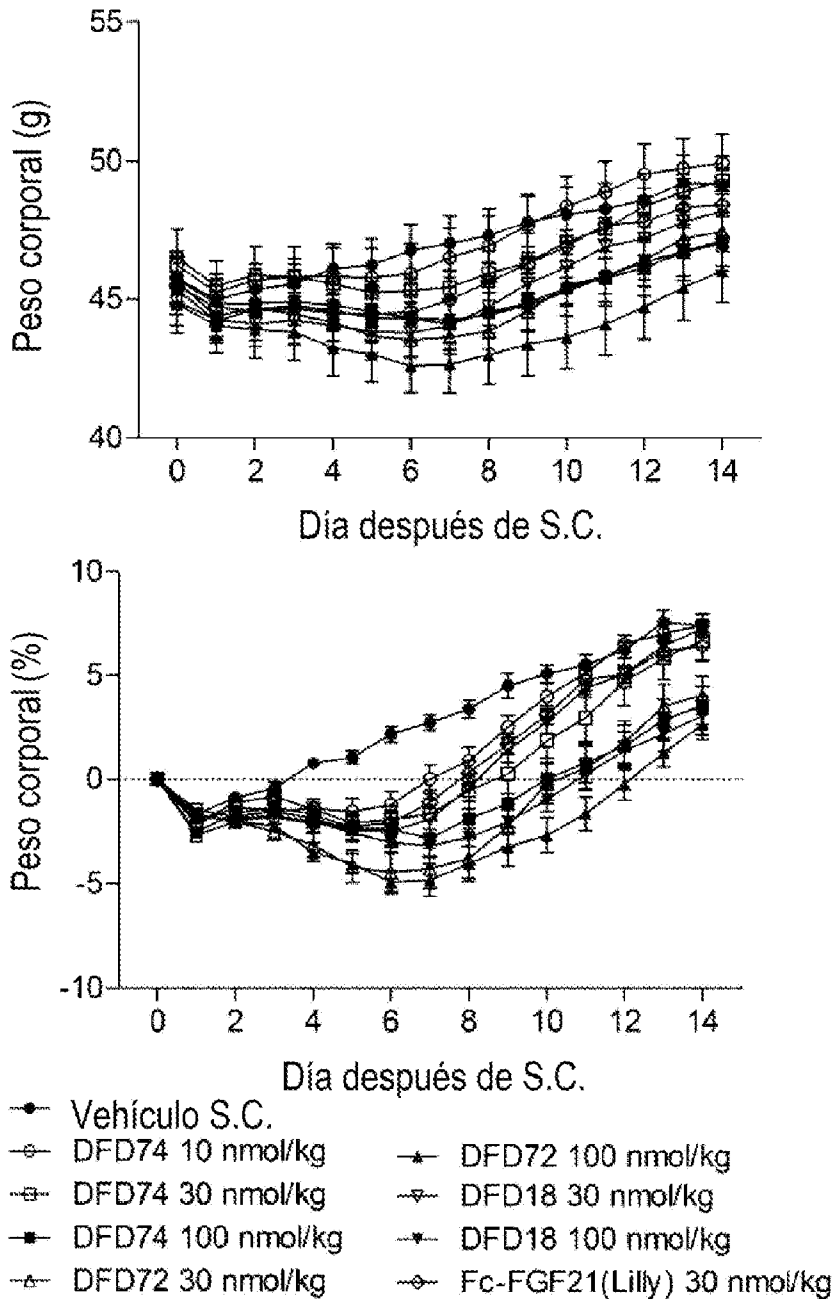


[Fig. 6]

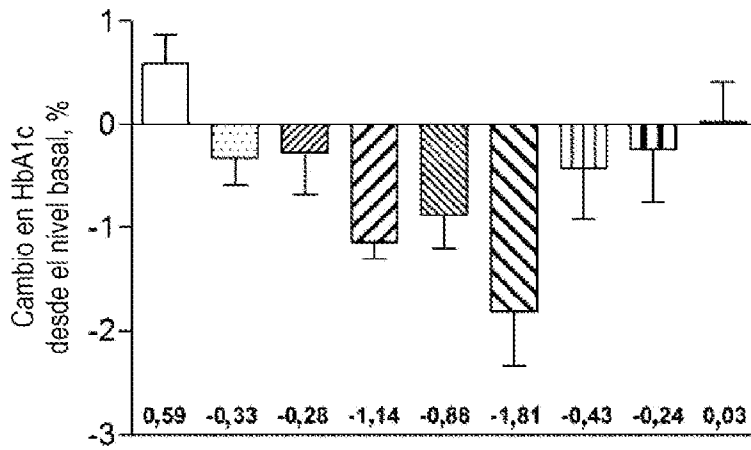
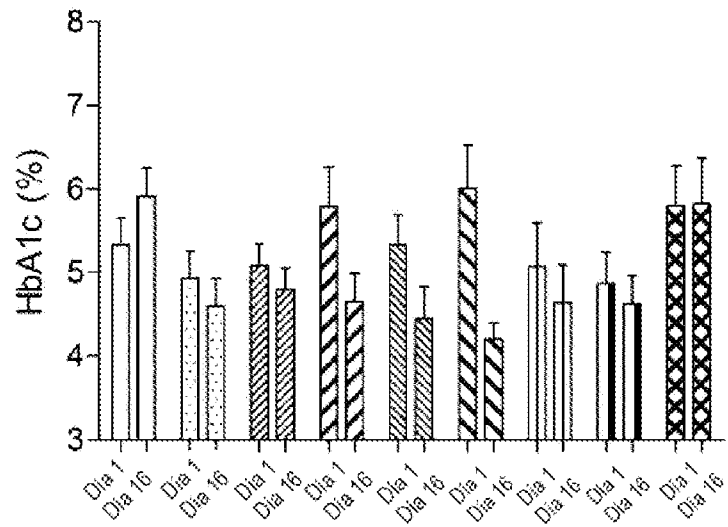


- Vehículo (PBS)
- DFD74 10 nmol/kg
- ◻ DFD74 30 nmol/kg
- DFD74 100 nmol/kg
- ▲ DFD72 30 nmol/kg
- ★ DFD72 100 nmol/kg
- ▼ DFD18 30 nmol/kg
- ▼ DFD18 100 nmol/kg
- ◇ Fc-FGF21(Lilly) 30 nmol/kg

[Fig. 7]

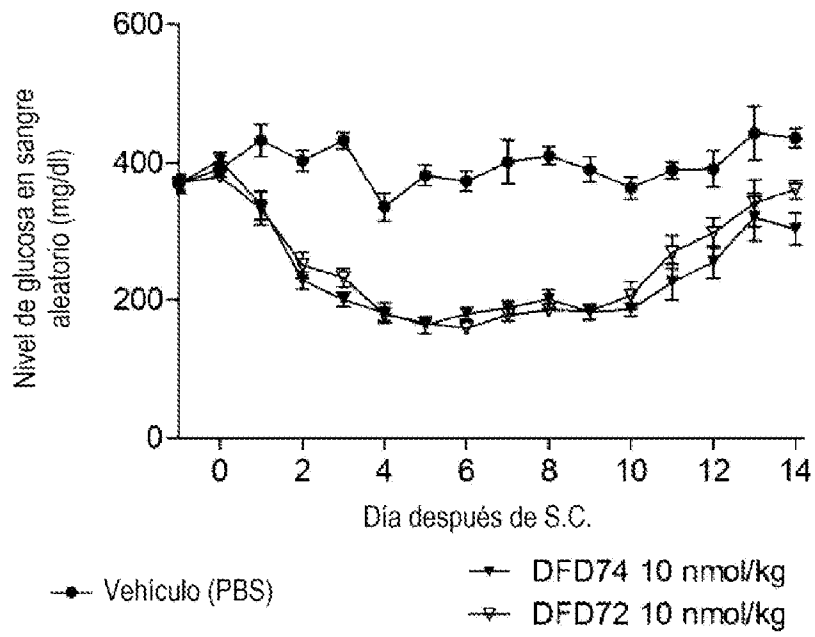


[Fig. 8]

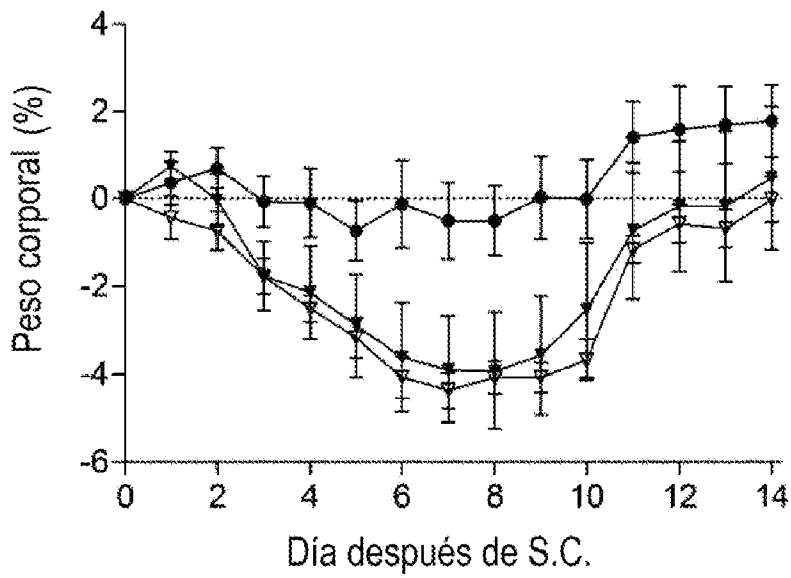
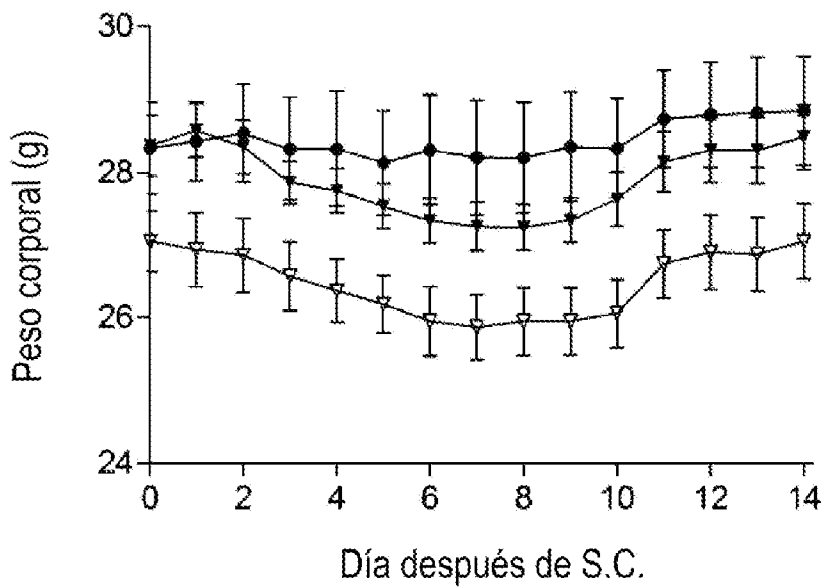


- Vehículo (PBS)
- ▤ DFD74 10 nmol/kg
- ▥ DFD74 30 nmol/kg
- ▧ DFD74 100 nmol/kg
- ▨ DFD72 30 nmol/kg
- ▩ DFD72 100 nmol/kg
- DFD18 30 nmol/kg
- DFD18 100 nmol/kg
- ▬ Fc-FGF21(Lilly) 30 nmol/kg

[Fig. 9]

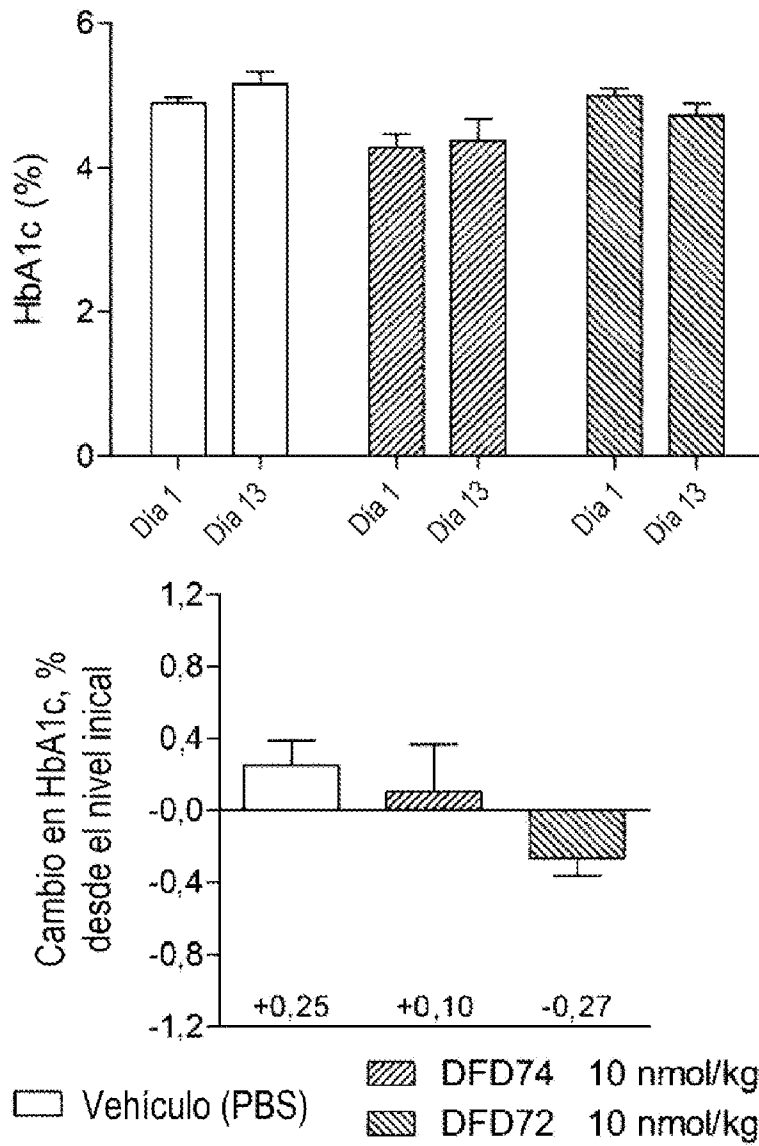


[Fig. 10]

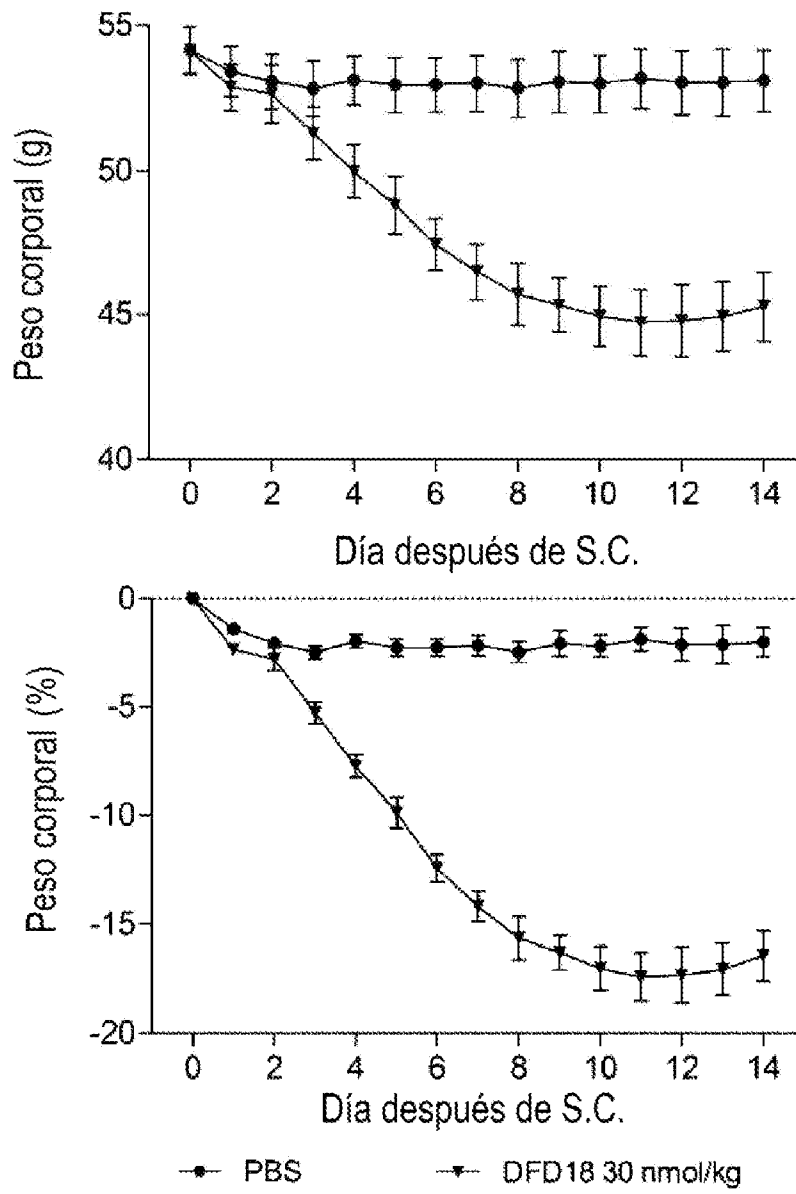


● Vehículo (PBS) ▲ DFD74 10 nmol/kg
 ▼ DFD72 10 nmol/kg

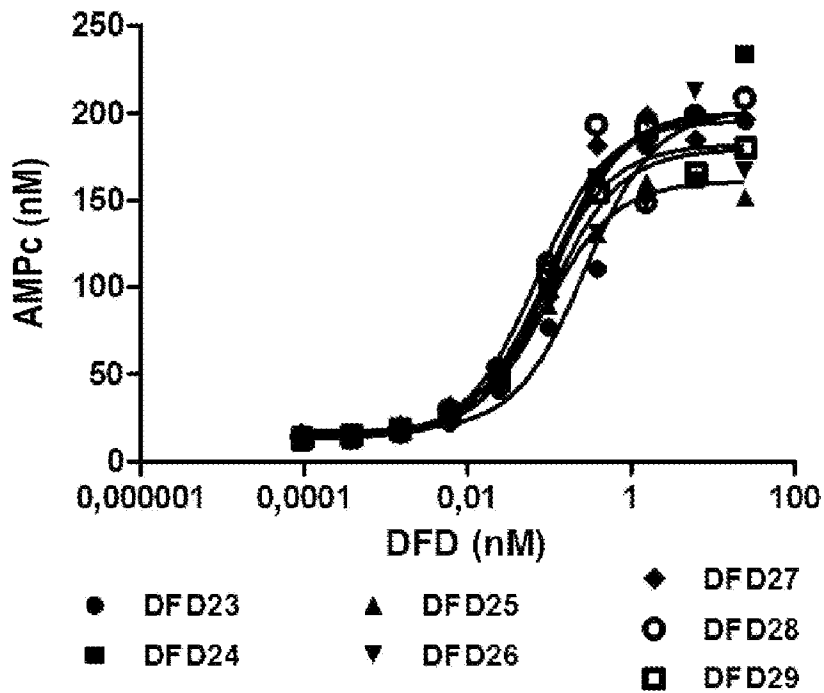
[Fig. 11]



[Fig. 12]



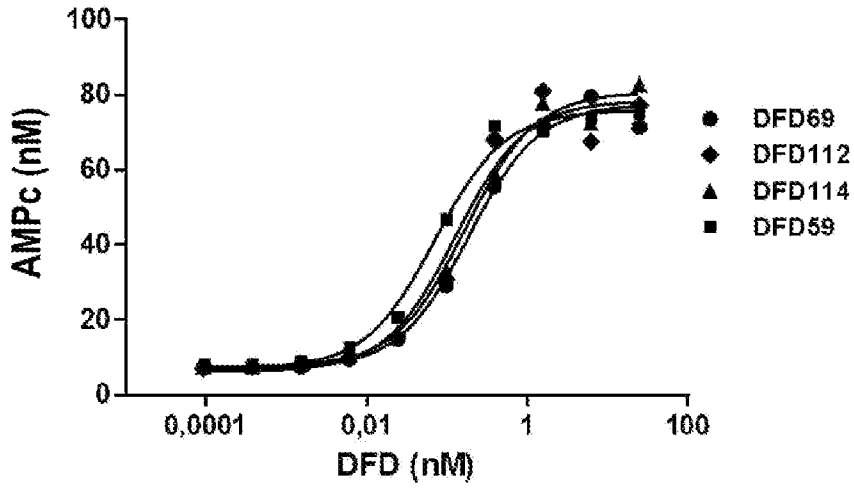
[Fig. 13]



	CE_{50} (pM)
DFD23	272,8
DFD24	107,4
DFD25	88,6
DFD26	104,9
DFD27	99,0
DFD28	69,7
DFD29	78,6

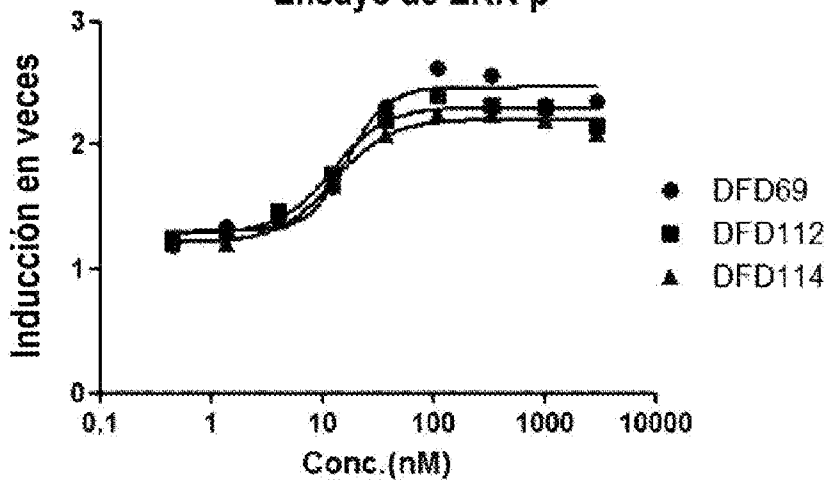
[Fig. 14]

Ensayo de AMPc



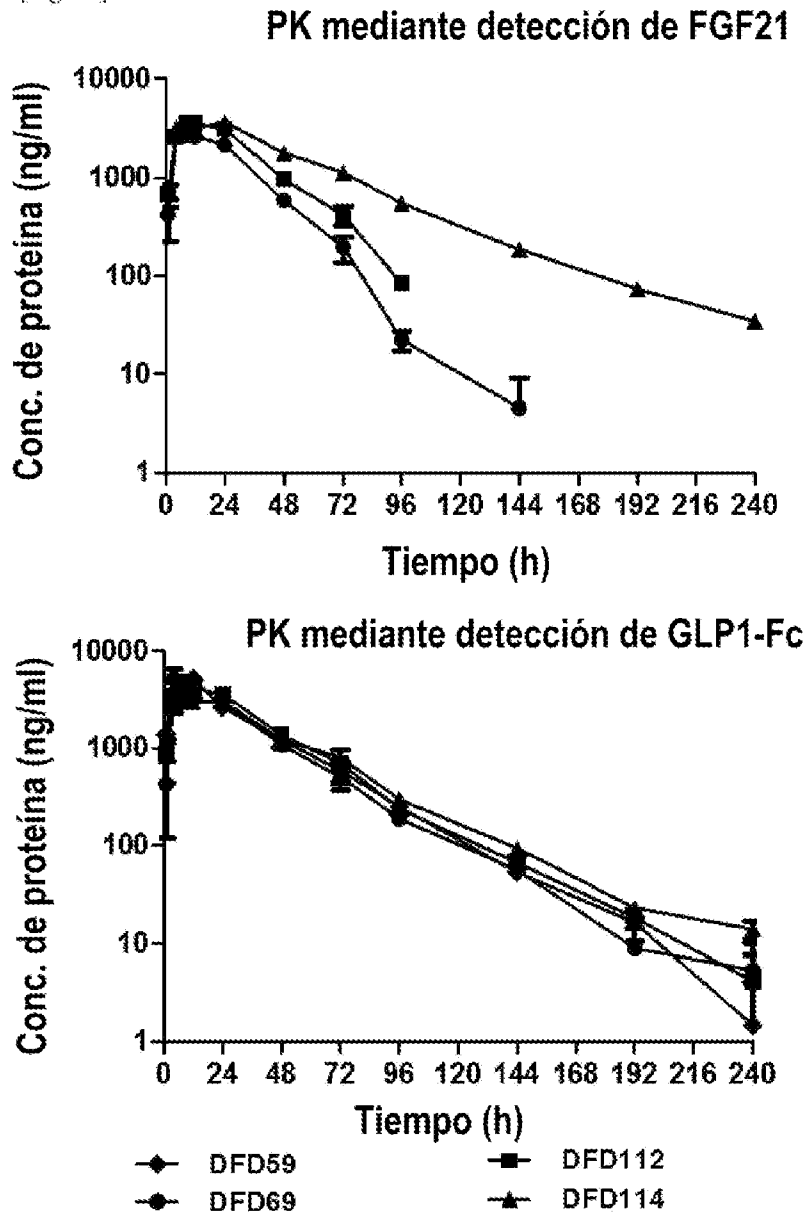
	DFD69	DFD112	DFD114	DFD59
CE ₅₀ (pM)	187,5	129,5	168,8	72,1

Ensayo de ERK-p

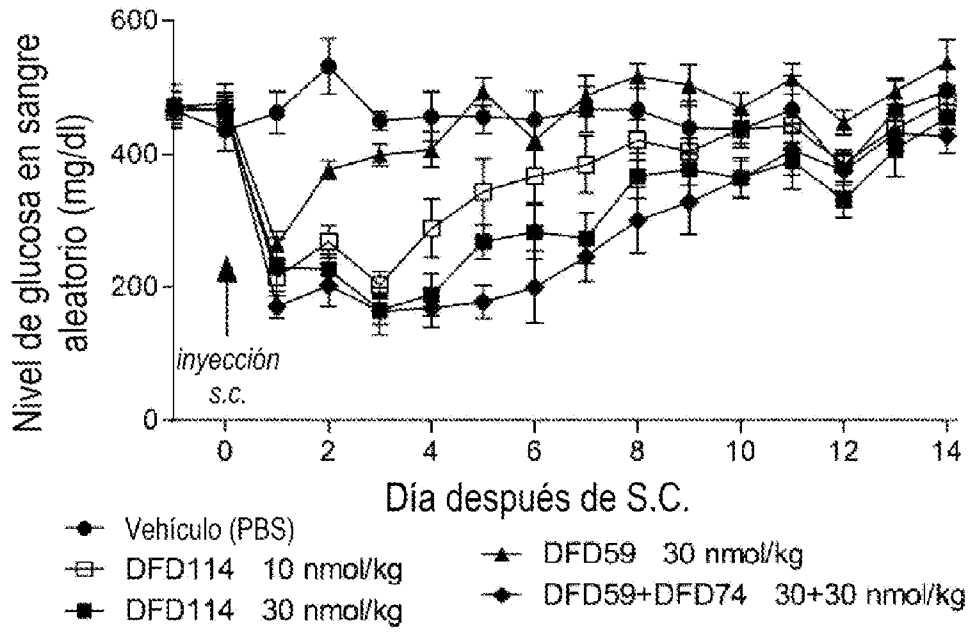


	DFD69	DFD112	DFD114
CE ₅₀ (pM)	16,84	12,16	15,52

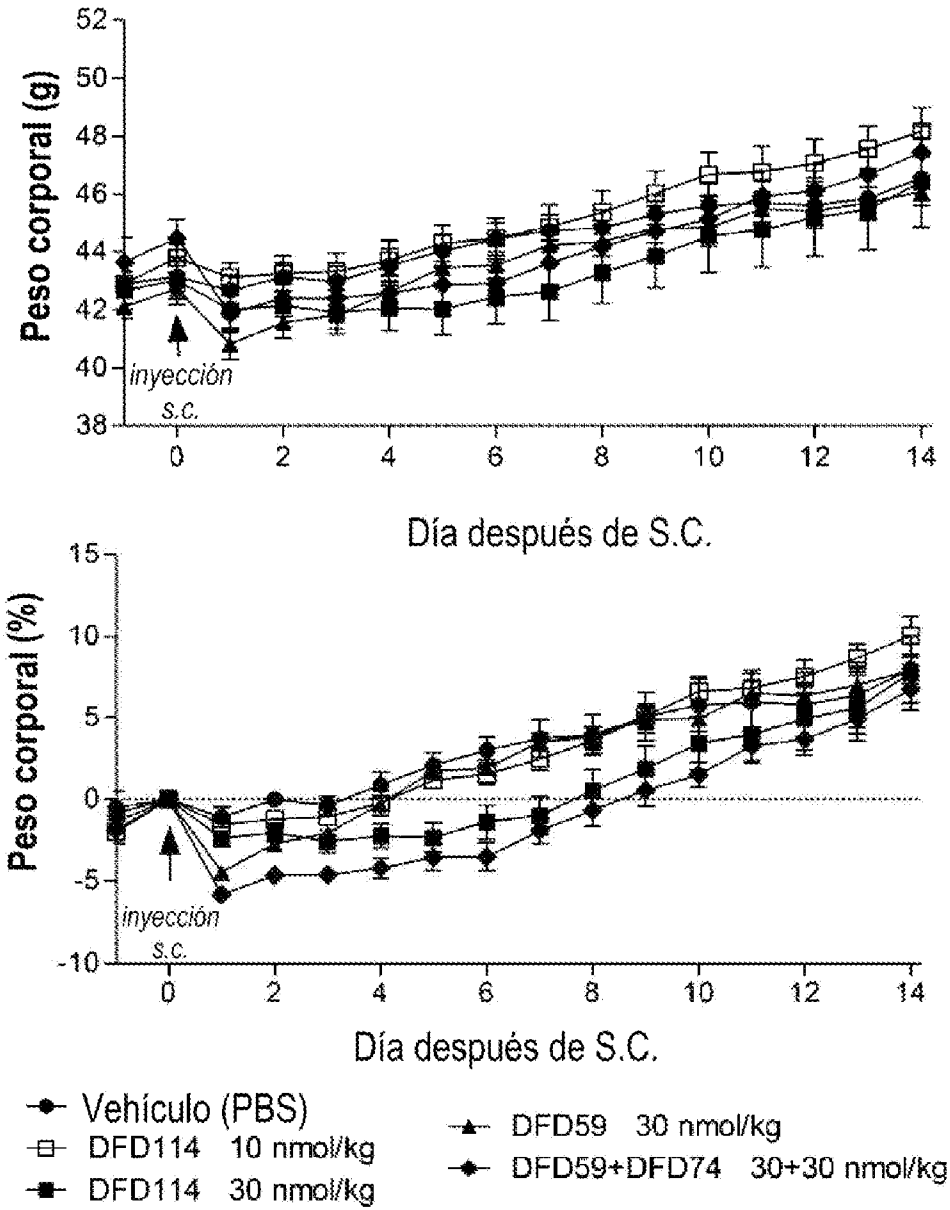
[Fig. 15]



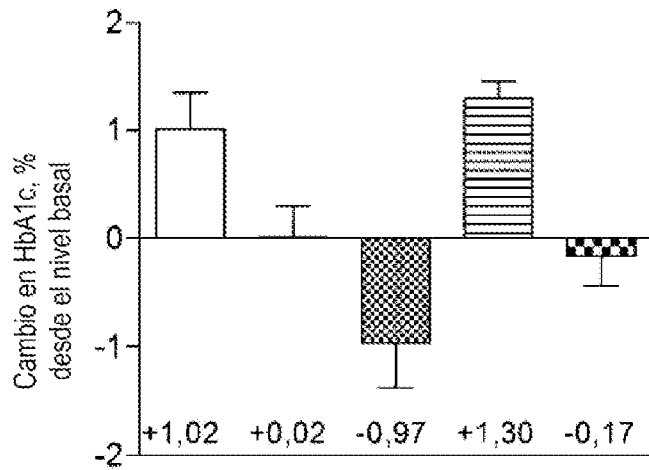
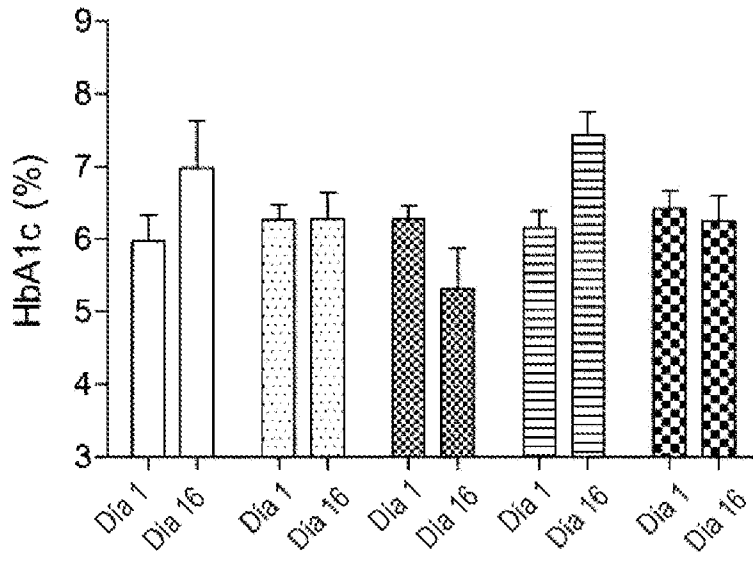
[Fig. 16]



[Fig. 17]

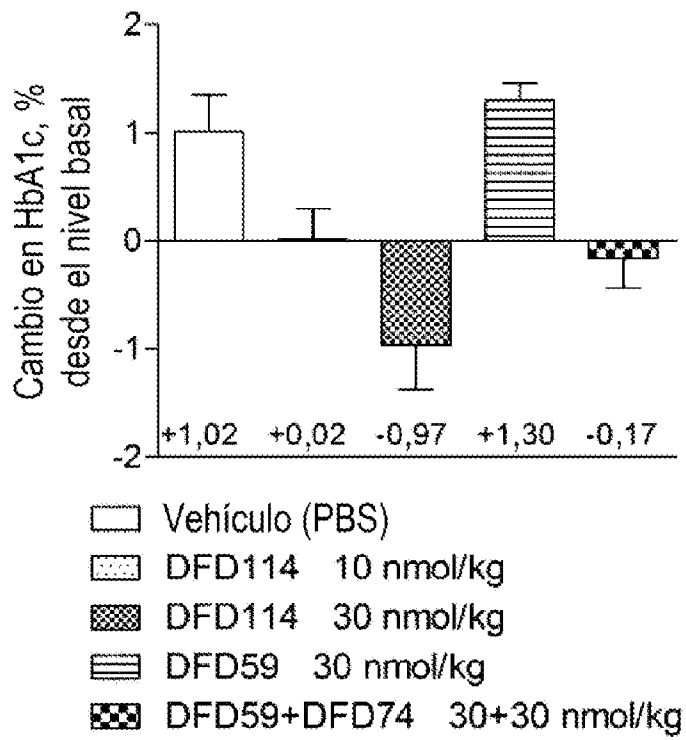


[Fig. 18]

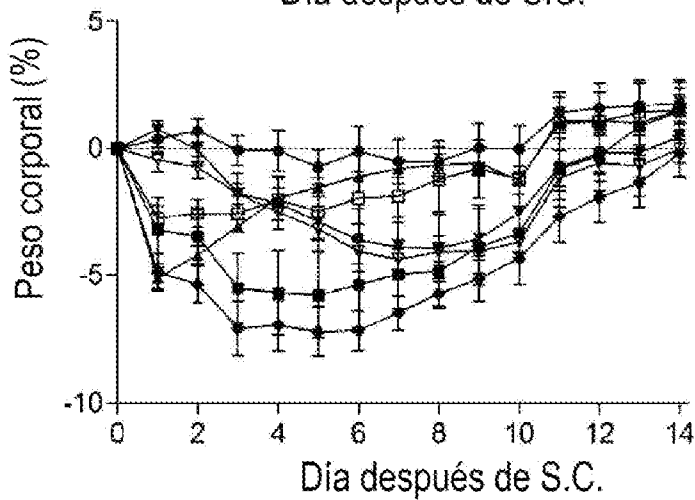
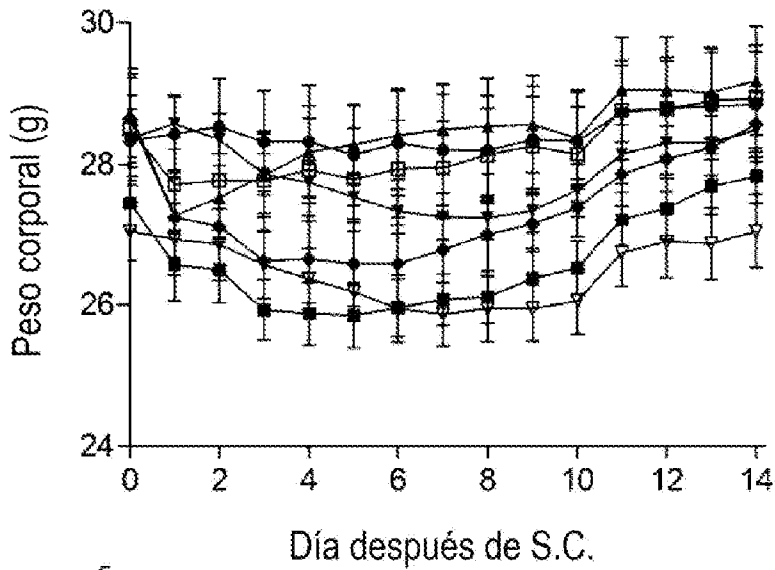


- Vehículo (PBS)
- ▨ DFD114 10 nmol/kg
- ▩ DFD114 30 nmol/kg
- ▧ DFD59 30 nmol/kg
- ▣ DFD59+DFD74 30+30 nmol/kg

[Fig. 19]



[Fig. 20]



- Vehículo (PBS)
- DFD114 3 nmol/kg
- DFD114 10 nmol/kg
- ▲ DFD59 10 nmol/kg
- ▼ DFD74 10 nmol/kg
- ▽ DFD72 10 nmol/kg
- ◆ DFD59+DFD74 10+10 nmol/kg

[Fig. 21]

