

COMPUESTOS AGONISTAS DEL FACTOR DE DIFERENCIACIÓN DEL CRECIMIENTO 15 Y SUS MÉTODOS DE USO

[0001] La divulgación se refiere a la biología y la medicina, y más particularmente, se refiere a compuestos y composiciones que incluyen un compuesto agonista del factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15) que tiene un tiempo de acción extendido y otras propiedades ventajosas, así como también métodos de uso de este para inducir la pérdida de peso y para el tratamiento de la diabetes, dislipidemia, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y/u obesidad.

[0002] GDF15 (también conocido como MIC-1, NAG-1) es una proteína de nudo de cisteína (Cis, C) que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). Su concentración en circulación se ha implicado en varias funciones biológicas, como la caquexia y el metabolismo del cáncer (véase Emmerson *et al.* (2017) *Nat. Med.* 23:1215-1219). El GDF15 humano maduro (SEQ ID NO:1) es un péptido de 112 aminoácidos. El GDF15 circulante forma un homodímero de la proteína madura (25 kDa) a través de lo que se informa como un enlace de disulfuro intercatenario entre el residuo Cis en la posición 77 de SEQ ID NO:1 en cada cadena del homodímero (que corresponde a la posición 316 de SEQ ID NO:2). Se cree que la formación de homodímeros es necesaria para la actividad biológica de GDF15 (véase la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2017/147743).

[0003] Entre las muchas funciones biológicas informadas de un homodímero GDF15 maduro, la regulación de la homeostasis energética ha ganado atención debido a su potencial para tratar la obesidad y la diabetes tipo 2 (T2D). Una conexión entre la actividad del homodímero GDF15 maduro y la homeostasis energética se basa en la observación de que los niveles séricos crecientes de GDF15 maduros se correlacionan con la pérdida de peso en individuos con cáncer de próstata avanzado (Emmerson *et al.* (2017)).

[0004] Además, el aumento de GDF15 en ratones mediante la administración de GDF15 recombinante o mediante su expresión y secreción de xenoinjertos tumorales ilustró que GDF15 induce la pérdida de peso a través de su capacidad para disminuir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético. Además, los ratones transgénicos que sobreexpresan el GDF15 fueron resistentes a la obesidad inducida por la dieta y mostraron una tolerancia a la glucosa mejorada, mientras que los ratones *knockout* del GDF15 tuvieron un mayor peso corporal y masa grasa. Se demostró además que la

pérdida de peso inducida por GDF15 reduce las respuestas inflamatorias y aumenta la vida útil de los roedores.

[0005] El receptor de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) de tipo alfa (GFRAL) ha sido identificado como el receptor de fijación de ligandos para el GDF15. La pérdida del efecto anoréxico del GDF15 en ratones con deficiencia de GFRAL, así como en ratas a las que se les administró un anticuerpo monoclonal neutralizador anti-GFRAL ilustró que el GFRAL es el principal responsable de los efectos metabólicos del GDF15 (Emmerson *et al.* (2017)).

[0006] La vida media natural ($t_{1/2}$) del agonista homodímero de GDF15 humano maduro en circulación es relativamente corta (alrededor de 2-3 horas). Sin embargo, la publicación de solicitud de patente internacional. N.º WO 2015/017710 describe en general la extensión de $t_{1/2}$ de los agonistas de GDF15 a través de diversas conjugaciones, incluida la conjugación con un fragmento cristalizante en la región (Fc).

[0007] Existe la necesidad de compuestos de GDF15 biológicamente activos con un tiempo de acción prolongado que pueda usarse en el tratamiento para inducir la pérdida de peso y para tratar la T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad. Un compuesto terapéuticamente deseable agonizaría el receptor GFRAL y proporcionaría propiedades ventajosas. Una propiedad ventajosa sería inducir la pérdida de peso. Otra propiedad ventajosa sería la estabilidad *in vivo* durante un período prolongado de tiempo en el rango terapéutico para permitir un nivel estable de fármaco en el torrente sanguíneo con una dosis semanal para lograr el efecto terapéutico deseado. Otras propiedades deseables también incluyen la disminución de la inmunogenicidad. Además, un compuesto deseable tendría propiedades de estabilidad física y/o química ventajosas.

[0008] En vista de lo anterior, la divulgación describe compuestos agonistas GDF15 biológicamente activos que tienen una $t_{1/2}$ extendida y otras propiedades deseables. Más específicamente, los compuestos de la presente son proteínas de fusión recombinantes que tienen un IgG4 Fc humano monomérico sin bisagra (una unidad de Fc por GDF15) ligado a través de un ligador rígido al término amino (N) de un compuesto análogo de GDF15, por lo que los compuestos forman un enlace covalente homodímero a través de al menos un enlace disulfuro intercatenario entre las porciones GDF15 de cada uno de los monómeros. Un compuesto de ejemplo, el Compuesto 2, es un homodímero de dos moléculas de Compuesto 1 (SEQ ID NO:2) y ha mostrado sorprendentemente una $t_{1/2}$ mejorada de hasta alrededor de 117 horas, lo que puede proporcionar una eficacia extendida y puede permitir una dosis semanal del compuesto. Los compuestos de la presente también tienen una estabilidad física mejorada. Por ejemplo, el Compuesto 2

tiene un bajo agregado soluble de alto peso molecular (HMW) de 4,1 % en el grupo de captura de Proteína A. El Compuesto 2 también exhibe una estabilidad química mejorada, tal como un bajo crecimiento porcentual de 0,75 % de bajo peso molecular (LMW) a 1 mg/ml después de 4 semanas de almacenamiento a 40 °C en citrato a pH 6,0.

[0009] En una forma de realización, se proporciona un compuesto que comprende SEQ ID NO:2.

[0010] En otra forma de realización, se proporciona un compuesto que incluye un homodímero que comprende dos monómeros, cada uno de los cuales incluye SEQ ID NO:2, en donde los dos monómeros están ligados a través de al menos un enlace de disulfuro intercatenario entre un residuo Cis del primer monómero y un residuo Cis del segundo monómero.

[0011] En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto que tiene SEQ ID NO:2 o un homodímero de dos monómeros de SEQ ID NO:2 y uno o más excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

[0012] En otra forma de realización, se proporciona un método para inducir la pérdida de peso o para tratar la T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad en un individuo que incluye administrar al individuo una cantidad eficaz de un compuesto con SEQ ID NO:2, un homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto que tiene SEQ ID NO:2 o el homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2.

[0013] En otra forma de realización, se proporciona un compuesto que incluye SEQ ID NO:2 o un homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2 para uso en tratamientos. Alternativamente, se proporciona un compuesto que incluye SEQ ID NO:2 o un homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2 para uso en la inducción de pérdida de peso o para uso en el tratamiento de T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad.

[0014] En otra forma de realización, se proporcionan usos para un compuesto que incluye SEQ ID NO:2 o un homodímero que comprende dos monómeros de SEQ ID NO:2 en la fabricación de un medicamento para inducir la pérdida de peso o para tratar la T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad.

[0015] En otras formas de realización, se proporciona un compuesto que se produce mediante el cultivo de una célula de mamífero que incluye una molécula de ADNc que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en condiciones tales que el polipéptido se expresa, y recupera el compuesto.

Adicionalmente, se proporciona un método para inducir la pérdida de peso en un individuo o para tratar la T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad que incluye administrar al individuo una cantidad eficaz de un compuesto o una composición de la presente una vez por semana.

[0016] Como se usa en la presente, "alrededor de" significa dentro de un rango estadísticamente significativo de un valor o valores como, por ejemplo, una concentración dada, una longitud, un peso molecular, un pH, una identidad de secuencia, un marco de tiempo, una temperatura, un volumen, etc. Tal valor o rango puede estar dentro de un orden de magnitud típicamente dentro del 20 %, más típicamente dentro del 10 %, e incluso más típicamente dentro del 5 % de un valor o rango dado. La variación admisible comprendida por "alrededor de" dependerá del sistema particular que se estudie y puede ser determinada con facilidad por una persona del oficio de nivel medio.

[0017] Como se usa en la presente, "cantidad eficaz" significa una cantidad o dosis de un compuesto en la presente o una composición farmacéutica que contiene un compuesto en la presente, que después de la administración de una dosis única o múltiple al paciente o sujeto, provocará la respuesta médica o biológica o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que busca el investigador, veterinario, médico u otro clínico. Preferiblemente, una cantidad eficaz de un compuesto o composiciones que contienen un compuesto de la presente invención para un paciente que lo necesite daría como resultado una pérdida neta de peso corporal. Una dosis puede incluir una dosis de carga inicial más alta, seguida de una dosis más baja.

[0018] Tal como se usa en la presente, "individuo", "paciente" y "sujeto" se usan de manera intercambiable y significan un animal, especialmente un humano. Cuando se trata de un ser humano, el individuo se caracteriza por una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la administración de un compuesto o composición en la presente.

[0019] Tal como se usa en la presente, "tratamiento" o "tratar" significa administrar y cuidar a un individuo que tiene una afección para la cual la administración de GDF15 está indicada con el propósito de combatir o aliviar los síntomas y las complicaciones de esas afecciones. El tratamiento incluye administrar un compuesto o composición que incluya un compuesto en la presente a un individuo que lo necesite para prevenir la aparición de síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad, afección o trastorno. En particular, el tratamiento incluye la

administración de un compuesto o composición que incluya un compuesto en la presente a un individuo que lo necesite para dar como resultado una pérdida neta de peso corporal. El individuo que está siendo tratado puede ser un animal, especialmente un humano.

[0020] Las composiciones farmacéuticas en la presente pueden administrarse por vía parenteral a un individuo que necesita dicho tratamiento. La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa con forma de bolígrafo, o un inyector de accionamiento mecánico. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Además, las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas que utilizan excipientes convencionales para productos farmacéuticos que son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21^{va} edición, University of the Sciences en Filadelfia, Filadelfia, PA, USA (2006)).

[0021] Los compuestos y composiciones de la presente pueden usarse en combinación simultánea, separada o secuencial con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para inducir la pérdida de peso y para tratar la diabetes, afecciones relacionadas con T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad. Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos adicionales que pueden combinarse con los compuestos reivindicados incluyen, entre otros, insulina o análogos de insulina; biguanidas; sulfonilureas; tiazolidinedionas; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 ("DPP-4"); inhibidores del transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT2); compuestos de incretina tales como los análogos de glucagon-peptido-1 (GLP-1) o GLP-1, polipéptido inhibidor gástrico (GIP) o análogos de GIP, oxintomodulina (OXM) o análogos OXM o combinaciones de cualquiera de los agentes anteriores. Los compuestos en la presente y el(los) agente(s) terapéutico(s) adicionales se pueden administrar juntos a través de la misma vía de administración y dispositivo, como una píldora única, cápsula, tableta o formulación inyectable; o administrarse por separado, ya sea al mismo tiempo en dispositivos de administración separados o de manera secuencial.

[0022] Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de técnicas conocidas por una persona del oficio de nivel medio. Por ejemplo, los compuestos pueden prepararse a través de la producción de una proteína o molécula de proteína precursora mediante técnicas de ADN recombinante. El ADN, incluido el

ADNc y el ADN sintético, puede ser de cadena doble o monocatenario. Las secuencias de codificación que codifican los compuestos pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético. El ADN puede introducirse en una célula huésped para producir el compuesto o precursor de este. Las células huéspedes pueden ser células bacterianas como las cepas K12 o B de *Escherichia coli*, células fúngicas como células de levadura o células de mamíferos como células de ovario de hámster chino ("CHO").

[0023] Una célula huésped apropiada se transfecta o se transforma de forma transitoria o estable con un sistema de expresión, tal como vectores de expresión, para producir un compuesto o un precursor de este. Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Por lo general, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección como, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, glutamina sintetasa y dihidrofolato reductasa, para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

[0024] Los compuestos en la presente pueden prepararse mediante una variedad de técnicas conocidas por una persona del oficio de nivel medio, así como los métodos descritos a continuación. Los pasos biosintéticos o sintéticos específicos para cada uno de los pasos descritos pueden usarse, no usarse o combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos de la presente.

[0025] Los compuestos análogos de GDF15 en la presente pueden actuar como compuestos GFRAL y se producen en un sistema de expresión de células de mamíferos mediante derivados de células CHOK1. Los genes que codifican las proteínas GDF15 se subclonan en estructuras principales de plásmidos de expresión que contienen glutamina sintetasa (GS) (plásmidos a base de pEE12.4). La secuencia de ADNc (SEQ ID NO:16) que codifica el Compuesto 1 (SEQ ID NO:2), una proteína Fc-GDF15 ejemplar, se fusiona en el marco con la secuencia de codificación de una secuencia peptídica señal, METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:3) para mejorar la secreción del producto deseado en el medio de cultivo tisular.

[0026] La expresión está dirigida por el promotor del citomegalovirus viral (CMV). Las células CHOK1SV se transfectan de manera estable mediante la electroporación y la cantidad apropiada de plásmido de expresión recombinante, y las células transfectadas se mantienen en cultivo en suspensión a una densidad celular adecuada. La selección de las células transfectadas se consigue mediante el crecimiento en un medio libre de suero que contiene 25 μ M de metionina sulfoximina (MSX) e incubado a alrededor de

35 °C - 37 °C y alrededor de 5-7 % de CO₂. Las proteínas GDF15 o las proteínas de fusión Fc-GDF15 se secretan en el medio de las células CHO. Las porciones GDF15 de las proteínas se asocian entre sí, lo que crea homodímeros que comprenden dos proteínas GDF15 o homodímeros de proteína de fusión Fc-GDF15 conectados entre sí a través de un enlace disulfuro intercatenario. Los homodímeros GDF15 o Fc-GDF15 pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguida de intercambio aniónico y cromatografía hidrófoba.

[0027] Los homodímeros de proteína GDF15 de los medios recolectados se capturan en una resina Azul Capto (GE). Los homodímeros de proteína Fc-GDF15 de los medios recolectados se capturan en la resina de proteína A Mab Select (GE). La resina luego se lava brevemente con un amortiguador de corrida, como una solución salina amortiguada con fosfato (PBS; pH 7,4) o un amortiguador de corrida que contiene Tris, para eliminar el material no fijado específicamente. La proteína se eluye de la resina con una solución de pH bajo, como ácido cítrico 10 mM pH 3. Las fracciones que contienen proteínas GDF15 se combinan y se pueden mantener a un pH bajo para desactivar virus potenciales. El pH puede neutralizarse al agregar una base como Tris 0,1 M pH 8,0. La proteína GDF15 puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico a través resinas tales como Poros XQ (Life Technologies). La proteína GDF15 se eluye de la columna AEX al utilizar un gradiente de NaCl de 0 a 200 mM en 50 mM de Tris, pH 8,0 sobre un volumen de 15 columnas.

[0028] La proteína de fusión Fc-GDF15 puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba a través de una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). La columna se realiza mediante el ajuste de la solución de carga alrededor de 0,5 M de sulfato de sodio y se eluye mediante un gradiente de volumen de 10 columnas (CV) que va de 0,5 M a 0 M de sulfato de sodio en una solución de Tris 20 mM pH 8. Después de la HIC, la proteína se puede purificar aún más mediante cromatografía de exclusión por tamaño al cargar el grupo concentrado de Capto Phenyl ImpRes en un Superdex200 (GE Healthcare) con elución isocrática en PBS pH 7,4.

[0029] Los compuestos de GDF15 purificados se pueden pasar a través de un filtro de retención viral como Planova 20N (Asahi Kasei Medical) seguido de concentración/diafiltración en citrato 10 mM, NaCl 150 mM pH 7, mediante ultrafiltración de flujo tangencial en una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

[0030] El dominio extracelular de GFRAL humano soluble (ECD) se produce en un sistema de expresión de células de mamífero mediante derivados de células CHOK1.

El GFRAL ECD marcado con polihistidina de los medios recolectados se captura en una cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados con níquel (IMAC). La resina luego se lava brevemente con un amortiguador de corrida, como un PBS pH 7,4, o un amortiguador de corrida que contiene Tris (pH 8,0, NaCl 500 mM) para eliminar el material no fijado específicamente. El GFRAL ECD marcado con HIS unido (SEQ ID NO:4) se eluye mediante 0-250 mM de imidazol en PBS o TRIS, pH 8,0, NaCl 500 mM en volúmenes de 10 columnas. El GFRAL ECD marcado con HIS se puede purificar aún más mediante cromatografía de exclusión por tamaño cargando el grupo de IMAC concentrado en un Superdex200 (GE Healthcare) con elución isocrática en PBS (pH 7,4).

[0031] La expresión de los anticuerpos en los mamíferos produce glicosilación. Típicamente, la glicosilación se produce en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Normalmente, los N-glicanos se fijan a la asparagina. En una región constante típica de las inmunoglobulinas IgG, solo hay un sitio para la glicosilación ligada a N. Este sitio se puede modificar, sin embargo, para evitar la glicosilación o se pueden agregar sitios adicionales para estructuras de glicosilación adicionales o diversas. Además, la glicosilación ocurre ocasionalmente en otras regiones de moléculas expresadas en células de mamíferos.

[0032] Los compuestos en la presente se preparan de esta manera o de una manera similar que se determinaría fácilmente por una persona del oficio de nivel medio.

EJEMPLOS

[0033] Los siguientes ejemplos no limitativos se ofrecen a fines ilustrativos, no limitativos.

[0034] Ejemplo 1: Afinidad de receptor *in vitro*

[0035] Los parámetros de fijación *in vitro* del homodímero GDF15 humano y el Compuesto 2 ejemplar a un receptor GFRAL humano se determinan por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR). El ECD de GFRAL incluye tres dominios ricos en Cis (D1, D2 y D3). La afinidad de un homodímero de GDF15 humano (des-ARN SEQ ID NO:1; es decir, GDF15 que carece de Ala, Arg y Asp desde la terminal N) y el Compuesto 2, un homodímero del Compuesto 1 Fc-GDF15 (SEQ ID NO:2) al GFRAL ECD humano marcado con HIS (SEQ ID NO:4) puede medirse por SPR. Las cinéticas se resumen en la tabla 1.

[0036] Para medir la fijación del GDF15 humano (des-ARN SEQ ID NO:1) o del Compuesto 2 al GFRAL ECD humano, se utiliza un instrumento Biacore T200 para medir la cinética de fijación del homodímero GDF15 humano (des-ARN SEQ ID NO:1) y el

Compuesto 2 al GFRAL ECD. Las mediciones se realizan a 25 °C. Las muestras se disuelven en HBS-EP+, pH 7,4 (GE Healthcare; 10 mM HEPES pH 7,4 + 150 mM NaCl + 3 mM EDTA + tensioactivo P20 al 0,05 %). El anticuerpo GDF15 (R&D) de anti-conejo de cabra se inmoviliza en las células de flujo de un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de aminas. Las muestras de GDF15 se preparan a 25 µg/ml por dilución en un amortiguador de corrida.

[0037] Las muestras de GFRAL ECD humano se preparan a concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 20 y 0 (en blanco) nM por dilución en el amortiguador de corrida. El experimento SPR incluye los siguientes pasos: (1) capturar muestras de GDF15 en células de flujo separadas (Fc2, Fc3 y Fc4), (2) inyectar 200 µl de GFRAL ECD humano en todas las células de flujo a 100 µl/min, (3) disociar durante 600 segundos, (4) regenerar las superficies del chip con una inyección de glicina de 10 µl (30 segundos), pH 1,5, a 20 µl/min, y (5) equilibrar las superficies del chip con una inyección de 10 µl (30 segundos) de HBS-EP+ a 20 µl/min. Cada concentración de GFRAL ECD humano se inyecta por duplicado.

[0038] Los datos se procesan mediante doble referencia estándar y se ajustan a un modelo de fijación 1:1 a través del software de evaluación Biacore T200 para determinar la tasa de asociación (k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$), tasa de disociación (k_{off} , s^{-1}) y respuesta máxima ($R_{máx}$; unidades de respuesta (RU)). La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calcula a partir de la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$ (M).

[0039] Tabla 1: Cinética de fijación del homodímero de GDF15 humano y del homodímero del Compuesto 2 al receptor de GFRAL ECD humano (D1-D2-D3-ECD) a 25 °C.

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

[0040] Los resultados muestran que el homodímero GDF15 humano (dos compuestos que comprenden des-ARN SEQ ID NO:1) tenía una afinidad de 7,2 nM para el GFRAL ECD humano, y el homodímero del Compuesto 2 (dos compuestos que comprenden SEQ ID NO:2) tenía una afinidad de 8,3 nM para GFRAL ECD humano.

[0041] Ejemplo 2: Actividad funcional *in vitro*

[0042] GFRAL, el receptor para GDF15, es un miembro de la familia de receptores

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

[0043] Para evaluar la actividad y la potencia relativa de las variantes de GDF15 humano maduro, las células HEK293 (ATCC) se transfectan con vectores de expresión de mamíferos dirigidos por CMV que contienen GFRAL humano (secuencia de referencia NCBI N.º NP_997293.2) y RET51 humano (secuencia de referencia NCBI N.º NP_066124.1) y crecen durante tres semanas en presencia de geneticina y puromicina (Life Technologies) para crear un grupo de células que expresan de manera estable ambas proteínas. La medición de la fosforilación de ERK1/2 se elige como un criterio de valoración para evaluar la activación de RET mediante un kit de ensayo AlphaLISA Surefire Ultra Phospho-ERK1/2 (Perkin Elmer), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y un lector de microplacas EnVision Multilabel modelo 2102 (Perkin Elmer).

[0044] Brevemente, las células HEK293-hGFRAL/HRET, entre el paso 10-20, se siembran a 20.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades recubiertas de poli-D-lisina y se cultivan durante tres días a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂/95 % de O₂. Las células se incuban en un medio libre de suero durante 4 horas y luego se tratan, como se indica, durante 10 minutos, se lisan y se congelan hasta que se analizan. Los lisados celulares se descongelan mediante incubación durante 1 hora a 4 °C, se mezclan en un agitador orbital de placas y se transfieren a una placa blanca de 384 cavidades. El método de “2 placas/1-incubación” de AlphaLISA se utiliza mediante el agregado de las mezclas de aceptor y donante, suministradas con el kit de ensayo, a los lisados e incubando a temperatura ambiente en la oscuridad durante 8 horas antes de medir la señal de AlphaLISA en el lector de placas EnVision.

[0045] Cada placa de células utilizada para un ensayo incluye GDF15 maduro nativo humano como estándar de referencia para el rendimiento del ensayo. Los datos de fosforilación de ERK1/2 (pERK1/2) de múltiples placas se recopilan en un solo gráfico mediante la conversión de los datos de la señal de AlphaLISA sin procesar en el eje Y a %Máxima en relación con el estándar de referencia humano GDF15 mediante la utilización de la siguiente fórmula:

$$\%Maxima = 100 * (x-min)/(max-min),$$

donde min = 0 y representa sin estimulación, max = 100 y representa la estimulación observada a una dosis saturada de compuesto, y x = cualquier tratamiento dado. Se

determina la EC₅₀ para cada compuesto mediante la utilización de una curva sigmoideal de dosis-respuesta de pendiente variable con cuatro parámetros de regresión logística en un prisma GraphPad versión 7.00. La EC₅₀ enumerada para cada compuesto en la Tabla 2 se determina al generar la media geométrica de la EC₅₀ para 3 ensayos independientes de cada compuesto mediante el uso de la siguiente fórmula:

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

[0046] Las células HEK293 que expresan tanto GFRAL humano como RET51 humano se usan para evaluar la potencia del Compuesto 2. El GDF15 maduro nativo humano (SEQ ID NO:1), como un homodímero, se usa como un estándar de referencia en cada placa de células. Los artículos de prueba se ejecutan por cuadruplicado en tres experimentos independientes.

[0047] Tabla 2: Comparación de la potencia del Compuesto 2 con GDF15 humano.

Artículo de prueba	EC ₅₀ (pM)	SEM	N
GDF15 humano maduro (homodímero de dos compuestos, que incluye SEQ ID NO:1)	27,9	2,9	3
Compuesto 2 (homodímero de dos compuestos que incluye SEQ ID NO:2)	86,2	5,8	3

Los datos de un experimento representativo se muestran como media ± SE

N, número de experimentos independientes

[0048] Ejemplo 3: Eficacia *in vivo* en modelos de rata normal

[0049] La obesidad es una comorbilidad común asociada con la diabetes y la resistencia a la insulina. Se ha informado que el GDF15 suprime la ingesta de alimentos, induce la pérdida de peso y mejora la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, un compuesto GDF15 puede ser eficaz en el tratamiento para inducir la pérdida de peso y para afecciones como la T2D, dislipidemia, NASH y/u obesidad. El compuesto 2 se administra en ratas Sprague Dawley macho durante un período de 15 días con mediciones diarias de peso corporal y consumo de alimentos.

[0050] Las ratas Sprague Dawley macho normales (Envigo; 14 semanas de edad) se mantienen con una dieta regular de comida al llegar a la instalación (TD2014; Teklad, Madison, WI) y se utilizan en los siguientes estudios. Los ratones se alojan individualmente en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (las luces se encienden a las 0600) y acceso libre a los alimentos (TD2014) y al agua.

[0051] Después de un mínimo de una semana de aclimatación a la instalación, los

ratones se aleatorizan según su peso corporal, por lo que cada grupo experimental de animales tendría un peso corporal similar. Los pesos corporales oscilaron entre 332 y 369 gramos.

[0052] Todos los grupos contienen cinco ratas. El vehículo o Compuesto 2 (rango de dosis de 0,01 a 0,3 mg/kg) disuelto en el vehículo (PBS) se administran mediante inyección subcutánea (SC) (1 ml/kg) a ratas normales alimentadas a demanda cada 3 días durante 15 días.

[0053] Las inyecciones subcutáneas se realizan en los días 1, 4, 7, 10 y 13. Las mediciones diarias del peso corporal y de ingesta de alimentos se realizan durante todo el período de estudio. El porcentaje de peso corporal se calcula diariamente a partir del peso corporal inicial de cada animal de la siguiente manera:

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

[0054] Todos los datos se presentan como la media $\pm$ SEM de cinco animales por grupo. Las concentraciones de dosis eficaces para el porcentaje de pérdida de peso y la ingesta de alimentos acumulada se determinan en el prisma GraphPad mediante la herramienta de ajuste no lineal. El análisis estadístico se realiza a través de medidas repetidas ANOVA, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas se identifican en *-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001, ****-p<0,0001.

[0055] Tabla 3: Efecto del tratamiento con el Compuesto 2 sobre el porcentaje de peso corporal y la ingesta acumulativa de alimentos en ratas SD normales.

Tratamiento	Peso corporal (%)	Ingesta Acumulativa de Alimentos (g)
Vehículo (1 ml/kg, SC)	106,69 $\pm$ 0,54	264,48 $\pm$ 7,28
Compuesto 2 (0,01 mg/kg)	93,34 $\pm$ 2,13*	193,04 $\pm$ 8,54*
Compuesto 2 (0,03 mg/kg)	85,18 $\pm$ 2,60*	155,42 $\pm$ 11,13*
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	81,80 $\pm$ 1,66*	122,54 $\pm$ 14,05*
Compuesto 2 (0,1 mg/kg)	78,30 $\pm$ 3,71*	115,74 $\pm$ 15,75*
Compuesto 2 (0,3 mg/kg)	73,57 $\pm$ 1,56*	91,22 $\pm$ 8,57*

Todos los datos se presentan como la media $\pm$ SEM de 5 animales por grupo desde el día 14. El análisis estadístico se realizó a través de medidas repetidas ANOVA, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples. Se identificaron diferencias significativas en *p<0,05.

[0056] El tratamiento crónico con el Compuesto 2 en ratas macho SD normales dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en la ingesta de alimentos y una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de peso corporal al finalizar el estudio en comparación con los animales tratados con vehículos de una manera dependiente de la dosis. La ingesta acumulativa de alimentos se reduce de

264,48 a 91,22 a la dosis más alta probada y la reducción de peso corporal varía de 7 % a 26 %. Los datos parecen indicar que el Compuesto 2 tiene un efecto estadísticamente significativo en la reducción del peso corporal y la ingesta de alimentos en ratas SD normales de manera dependiente de la dosis.

[0057] Ejemplo 4: Eficacia *in vivo* en ratones con obesidad inducida por dieta (DIO)

[0058] Para investigar el efecto del Compuesto 2 sobre la pérdida de peso, el metabolismo, la composición corporal y la esteatosis hepática, el Compuesto 2 se dosifica crónicamente a ratones DIO C57/Bl6.

[0059] Los ratones macho DIO C57/Bl6 (Taconic) de 24 a 25 semanas de edad, se mantienen con una dieta rica en calorías al llegar a la instalación (TD95217; Teklad, Madison, WI) y se utilizan en los siguientes estudios. Los ratones se alojan individualmente en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (las luces se encienden a las 2200) y acceso libre a los alimentos (TD95217) y al agua. Después de un mínimo de 2 semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se aleatorizan según su peso corporal, por lo que cada grupo experimental de animales tendría un peso corporal similar. Los pesos corporales oscilan entre 40 y 50 g.

[0060] Todos los grupos contienen cinco ratones. El vehículo o Compuesto 2 (0,002, 0,006, 0,02, 0,06 y 0,2 mg/kg) se disuelve en el vehículo (PBS) y se administran mediante inyección subcutánea (SC) (10 ml/kg) a ratones DIO alimentados a demanda, de 30 a 90 minutos antes del inicio del ciclo de oscuridad cada 3 días durante 21 días. Las inyecciones SC se realizan en los días 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 22. El peso corporal y la ingesta de alimentos se miden diariamente a lo largo del estudio.

[0061] Los cambios absolutos en el peso corporal se calculan al restar el peso corporal del mismo animal antes de la primera inyección de la molécula. En el día 17, los animales ayunan a las 0600 y a las 1300, se recoge sangre para medir la glucosa y la insulina en ayunas. La glucosa en sangre se mide con los glucómetros AccuChek® (Roche Diabetes Care, Inc.; Indianapolis, IN). La insulina se mide por ELISA (MSD, Rockville, MD). El índice de resistencia a la insulina se calcula mediante la fórmula:

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

[0062] El día 24, los animales se sacrifican antes del fotoperíodo oscuro y los hígados se extraen y se congelan. Los triglicéridos hepáticos, determinados a partir de homogeneizados de hígados recolectados en el sacrificio, y los analitos en plasma se miden en un analizador clínico Hitachi Modular P.

[0063] Tabla 4: Efecto del tratamiento con el Compuesto 2 en el peso corporal y la ingesta acumulativa de alimentos en ratones DIO en el día 16.

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

Todos los datos se presentan como media ± SEM de 5 animales por grupo.

Los valores se presentan como media ± SEM con n = 5. *p<0,05 en comparación con el grupo de vehículos; ANOVA unidireccional, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples.

[0064] Tabla 5: Efecto del tratamiento con el Compuesto 2 en la glucosa en suero, el colesterol, la alanina aminotransferasa (ALT) y los triglicéridos hepáticos en ratones DIO en el día 24.

Tratamiento	Glucosa (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	ALT (UI/l)	Triglicéridos hepáticos (mg/g tejido)
Vehículo (10 ml/kg, SC)	339,18 ± 30,58	271,80 ± 12,02	310,80 ± 34,92	210,10 ± 11,82
Compuesto 2 (0,002 mg/kg)	317,52 ± 17,95	220,80 ± 4,89*	231,60 ± 25,39	69,88 ± 18,88*
Compuesto 2 (0,006 mg/kg)	261,00 ± 20,43*	177,00 ± 7,82*	159,60 ± 73,32*	46,56 ± 13,85*
Compuesto 2 (0,02 mg/kg)	223,38 ± 16,02*	172,80 ± 18,51*	87,00 ± 13,04*	24,82 ± 8,80*
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	245,94 ± 10,10*	199,20 ± 15,34*	114,60 ± 22,72*	58,90 ± 14,45*
Compuesto 2 (0,2 mg/kg)	241,02 ± 8,88*	167,40 ± 8,72*	112,80 ± 19,15*	34,62 ± 10,88*

Los valores se presentan como media ± SEM con n = 5. *p<0,05 en comparación con el grupo de vehículo; ANOVA unidireccional, seguido de Dunnett.

[0065] Tabla 6: Efecto del tratamiento con el Compuesto 2 en la glucosa en sangre en ayunas, la insulina y el HOMA-IR en ratones DIO el día 17.

Tratamiento	Glucosa en ayunas (mmol/l)	Insulina en ayunas (mIU/l/ml)	HOMA-IR
Vehículo (10 ml/kg, SC)	6,80 ± 0,28	85,64 ± 13,68	25,78 ± 4,13
Compuesto 2 (0,002 mg/kg)	6,64 ± 0,28	45,94 ± 4,66*	13,51 ± 1,32*
Compuesto 2 (0,06 mg/kg)	5,16 ± 0,53*	26,44 ± 2,95*	6,22 ± 1,15*

Todos los datos se presentaron como media ± SEM de 5 animales por grupo a partir del día 17.

El análisis estadístico se realizó a través de medidas repetidas ANOVA, seguido del método de Dunnett para comparaciones múltiples.

Se identificaron diferencias significativas a $p < 0,05$.

[0066] El compuesto 2, en función de la dosis, reduce el peso corporal y la ingesta de alimentos en ratones DIO machos, lo que indica que podría usarse en el tratamiento para inducir la pérdida de peso y para la obesidad (Tabla 4). El compuesto 2 también reduce la glucosa sérica, lo que indica que podría usarse en el tratamiento para la diabetes (Tabla 5). El compuesto 2 reduce aún más el colesterol, lo que indica que podría usarse en el tratamiento para la dislipidemia (Tabla 5). El compuesto 2 mejora la salud del hígado (demostrado por la disminución de la ALT sérica) y reduce los triglicéridos hepáticos, lo que indica que podría usarse en el tratamiento para la NASH (Tabla 5). La prueba en ayunas de glucosa en sangre e insulina realizada el día 17 demuestra una mayor sensibilidad a la insulina y un índice de resistencia a la insulina reducido, lo que sustenta aún más la posibilidad de utilizar el Compuesto 2 en el tratamiento de la diabetes (Tabla 6).

[0067] Ejemplo 5: Estabilidad de diferentes constructos de Fc-GDF15

[0068] El agregado de proteínas en un producto farmacéutico no es deseable porque reduce el rendimiento de producción general y podría desencadenar una respuesta inmune cuando se administra a individuos. Por lo tanto, se prefiere mantener el compuesto en el estado monomérico, o en este caso un homodímero unido de manera covalente.

[0069] Para probar la propensión de diferentes proteínas de fusión GDF15 a agregarse y/o degradarse, varias proteínas de fusión Fc-GDF15 pueden expresarse en células CHO de mamíferos. Las proteínas de fusión Fc-GDF15 pueden capturarse en la proteína A de Mab Select (GE; Piscataway, NJ) con amortiguador de corrida PBS (pH 7,4); se puede lavar brevemente con amortiguador de corrida para eliminar el material no ligado específicamente; y se puede eluir con 20 mM de ácido acético y 5 mM de ácido

cítrico, pH 3. Las fracciones que contienen proteínas Fc-GDF15 se agrupan y el pH se neutraliza al agregar 1/10 de volumen de Tris 1 M, pH 8,0.

[0070] Luego se analiza el grupo de captura de proteína A mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar el porcentaje de agregado de alto peso molecular (HMW), que indica la cantidad de agregación que se produjo. El método de separación SEC se realiza en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 µm con dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil es PBSx1, NaCl 350 mM (pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min. Las muestras iniciales de baja concentración se aplican como inyecciones de 10 µl y se controlan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm. El % de especies de LMW indica estabilidad química o productos de degradación de pequeño peso molecular de un compuesto.

[0071] Tabla 7: Comparación de la estabilidad física y química de diferentes proteínas de fusión Fc-GDF15.

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

[0072] Un constructo de proteína de fusión Fc-GDF15 en tándem (dos porciones Fc similares de anticuerpo se unen entre sí de extremo a extremo, que contienen una región bisagra, y luego se unen a una molécula GDF15 donde las porciones GDF15 se autoasocian para crear una dímero), el Compuesto 3 (homodímero de dos moléculas, cada una de las cuales comprende SEQ ID NO:5) tiene un 60,8 % de HMW en comparación con el 4,1 % de HMW del Compuesto 2. Esto sugiere que el Compuesto 2 tiene una mejor estabilidad física, con menor agregación y menos riesgo de agregados inmunogénicos que un constructo de proteína de fusión Fc-GDF15 en tándem.

[0073] Un Fc-GDF15 heterodimérico (dos porciones Fc diferentes de un anticuerpo que se asocian entre sí en paralelo y donde una porción Fc (cadena B, SEQ ID NO:17) está asociada con otra porción Fc que está unida a una molécula GDF15 (cadena A, SEQ ID NO:6) y donde las porciones de GDF15 se autoasocian para crear un homodímero), el Compuesto 4 (un homodímero de dos moléculas, en donde cada molécula comprende un heterodímero de SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:17) tiene un alto LMW de especies del 49,1 % en comparación con el Compuesto 2, que tiene solo el 2,3 % de LMW, lo que sugiere que el Compuesto 2 tiene una mejor estabilidad química y una menor

propensión a las escisiones químicas o proteolíticas. La estabilidad química y evitar la degradación ayudan a conservar la potencia de un compuesto durante largos períodos de tiempo. Además, una menor degradación minimiza el riesgo de que los subproductos de degradación causen más problemas de potencia al interferir con el ingrediente activo en una formulación o que los subproductos de degradación se agreguen y causen problemas de inmunogenicidad.

[0074] Ejemplo 6: Estabilidad de mutaciones dobles en comparación con mutaciones únicas de Fc

[0075] La estructura única de la porción Fc de los compuestos de la presente, con dos mutaciones específicas, exhibe inesperadamente una mejor estabilidad y una mayor solubilidad en altas concentraciones que un constructo Fc con cualquiera de las mutaciones solas. Se generan dos Fc con una sola mutación para interrumpir la asociación CH3/CH3 en la IgG4-Fc y para crear un constructo Fc monomérico. El primero fue el Compuesto 7, con una glutamina sustituida por una fenilalanina en la posición 405 en una cadena pesada de IgG4 humana de longitud completa, correspondiente a la posición 173 en SEQ ID NO:2 (posición 175 en SEQ ID NO:9). El segundo mutante único generado fue el Compuesto 8, un Fc con un ácido glutámico sustituido por una tirosina en la posición 407 en una cadena pesada de IgG4 humana de longitud completa, correspondiente a la posición 175 en SEQ ID NO:2 (posición 177 en SEQ ID NO:10). También se genera un mutante Fc dual, Compuesto 5 (SEQ ID NO:7), y contiene ambas mutaciones Fc de los Compuestos 7 y 8. El Compuesto 5 es la misma secuencia que el Compuesto 2, excepto que dos aminoácidos adicionales, AP, están presentes en la terminal N de la región Fc en el Compuesto 5. Los compuestos 2, 5, 7 y 8 carecen de la región bisagra de ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:8) para asegurar la formación del IgG4 Fc monomérico.

[0076] Los compuestos en este ejemplo se expresan en células CHO de mamíferos, y los medios recolectados se capturan en proteína A de Mab Select (GE) con PBS (pH 7,4) en amortiguador de corrida; se lavó brevemente en amortiguador de corrida para eliminar el material no ligado específicamente; y se eluyó con 20 mM de ácido acético y 5 mM de ácido cítrico, pH 3,0. Las fracciones que contienen proteínas GDF15 se agrupan y el pH se neutraliza al agregar 1/10 de volumen de Tris 1 M, pH 8,0.

[0077] Los grupos de captura de proteína A neutralizada se someten luego a intercambio de amortiguador en citrato 10 mM pH 5,0 en un concentrador centrífugo Amicon Ultra de 0,5 ml con 10 MWCO. Los mutantes Fc-GDF15 simples y dobles se intentan a continuación hasta concentrar 10 mg/ml o más mediante un concentrador

centrífugo Amicon Ultra de 0,5 ml con 10 MWCO.

[0078] Tabla 8: Solubilidad máxima de fusiones GDF15 a pH 5,0.

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

[0079] Los resultados muestran que los mutantes Fc individuales, los homodímeros del Compuesto 7 y del Compuesto 8, tuvieron una solubilidad reducida en comparación con el mutante Fc doble, el homodímero del Compuesto 5. El homodímero del Compuesto 7 no pudo alcanzar 10 mg/ml debido a la precipitación y la pérdida de material. El homodímero del Compuesto 8 mostró una solubilidad mejorada en comparación con el homodímero del Compuesto 7; sin embargo, no pudo alcanzar 10 mg/ml debido a la pérdida de material durante el proceso de concentración. El homodímero del Compuesto 5, con la nueva mutación doble en el Fc, retuvo la solubilidad a 9,8 mg/ml. Un control monomérico de IgG4 Fc solo fue soluble hasta 12 mg/ml.

[0080] Ejemplo 7: Comparación de la estabilidad química para ligadores flexibles o rígidos

[0081] Para probar la estabilidad química de los compuestos de GDF15 en la presente, dichos compuestos pueden dializarse durante la noche a 4 °C en los siguientes amortiguadores: citrato 10 mM, pH 6 (C6), citrato 10 mM, pH 7 (C7), Tris 10 mM, pH 7,0 (T7), Tris 10 mM, pH 8,0 (T8) o 1x PBS, pH 7,4 (PBS). Para evaluar la estabilidad a largo plazo de las fusiones de Fc-GDF15, se pueden almacenar soluciones proteicas de 1,0 mg/ml en los respectivos amortiguadores a 4 °C, 25 °C y 40 °C durante 4 semanas, y el % de LMW se determina mediante SEC analítico.

[0082] El método de separación SEC se puede realizar en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 µm con dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil puede ser PBS, NaCl 350 mM, pH 7,4 a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Las muestras iniciales de baja concentración pueden aplicarse como inyecciones de 10 µl y monitorearse a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm.

[0083] Los cambios en la estabilidad química, medidos por % LMW, se evalúan en relación con el tiempo 0 de las muestras. Según lo determinado por los estudios realizados esencialmente como se describe anteriormente, el % de crecimiento de LMW para los compuestos de GDF15 se resumen en la Tabla 9.

[0084] Los compuestos probados son el Compuesto 2, un homodímero del Compuesto 1 (SEQ ID NO:2), con un ligador rígido G4-AP10-G4, un homodímero del Compuesto 5 (SEQ ID NO:7) con un ligador flexible L5Q (GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ (SEQ ID NO:12)), y un homodímero del Compuesto 6 (SEC ID NO:11), con un ligador rígido G4S-AP10-G4S.

[0085] Tabla 9: Crecimiento en % de LMW para compuestos GDF15 a 1 mg/ml según lo determinado por SEC analítico.

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

[0086] El ligador L5Q tiene un mayor % de LMW después del almacenamiento a 25 °C y 40 °C que cualquiera de los ligadores AP10, lo que sugiere una mayor propensión a la degradación química de las proteínas de fusión GDF15 que comprende un ligador flexible L5Q que una proteína que comprende un ligador rígido AP10 (APAPAPAPAPAPAPAPAPAP; SEQ ID NO:13). Además, el homodímero del Compuesto 6, con un ligador que comprende G4S (GGGGS; SEQ ID NO:14), tiene un mayor % de LMW que el Compuesto 2, con un ligador que comprende G4 (GGGG; SEQ ID NO:15), en la mayoría de las condiciones, lo que sugiere una mayor estabilidad química del Compuesto 2 con su ligador G4-AP10-G4.

[0087] La estabilidad química y física de los compuestos GDF15 con ligadores rígidos (Compuesto 2 y Compuesto 6) y flexibles (Compuesto 5) puede evaluarse a una concentración alta de 10 mg/ml. Los compuestos pueden ser primero dializados O/N a 4 °C en los siguientes amortiguadores: (a) 10 mM citrato pH 6,5; (b) 10 mM citrato, pH

6,5, 150 mM NaCl; y (c) 10 mM citrato, pH 6,5, polisorbato 80 al 0,02 %. Se añaden a la formulación excipientes como 150 mM NaCl y polisorbato al 0,02 % para probar su efecto sobre la estabilidad química y física de las fusiones de GDF15. A continuación, los compuestos pueden concentrarse a 10 mg/ml mediante 10.000 MWCO, 15 ml de concentradores Millipore Spin. Después de la concentración, el % de HMW y el % de LMW se pueden determinar por SEC mediante la proteína concentrada (t=0).

[0088] El método de separación SEC se puede realizar en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 µm con dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil fue PBS, NaCl 350 mM, pH 7,4 a un caudal de 0,5 ml/min. Las muestras de 10 mg/ml se diluyen a 1 mg/ml en sus respectivos amortiguadores y luego se aplican como inyecciones de 10 µl y se controlan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm.

[0089] Las formulaciones de 10 mg/ml pueden incubarse durante 4 semanas a 4 °C, 25 °C y 40 °C para evaluar la estabilidad a más largo plazo en condiciones de estrés. El % de LMW y el % de HMW pueden determinarse nuevamente a las 4 semanas (t = 4w) mediante SEC. Los cambios en la estabilidad química (% de LMW) pueden evaluarse en relación con las muestras de tiempo 0.

[0090] Tabla 10: Estabilidad química representada como crecimiento en % de LMW para compuestos GDF15 a 10 mg/ml.

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

[0091] Tabla 11: Estabilidad física representada como crecimiento en % de HMW para compuestos GDF15 a 10 mg/ml.

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

[0092] Como se muestra en la Tabla 10, el homodímero del Compuesto 5 a 10 mg/ml, que contiene un ligador flexible, mostró un nivel mayor de % de LMW que el homodímero del Compuesto 6, con un ligador rígido, a 25 °C y 40 °C, lo que indica una menor estabilidad química.

[0093] Como se muestra en la Tabla 11, el homodímero del Compuesto 5 a 10 mg/ml, que contiene un ligador flexible, mostró un nivel mayor de % de HMW que el homodímero del Compuesto 6, con un ligador rígido, lo que indica una menor estabilidad física. La baja estabilidad química y/o física puede causar precipitación y posibles problemas de inmunogenicidad.

[0094] Ejemplo 8: Comportamiento farmacocinético de los compuestos GDF15

[0095] El comportamiento farmacocinético del Compuesto 2 se prueba en monos. Las concentraciones plasmáticas de los compuestos de GDF15 se determinan mediante un método ELISA en Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). El método ELISA sándwich utiliza un anticuerpo GDF15 antihumano de cabra policlonal (Sistemas R&D/AF957) o un anticuerpo GDF15 antihumano/primado de ratón monoclonal (Sistemas R&D/MAB957) recubierto a 1 o 3 µg/ml como reactivo de captura. El compuesto GDF15 luego se detecta con un anticuerpo IgG4 pFc-HRP anti-humano de ratón (Southern Biotech/9190-05) o un anticuerpo IgG Fc-HRP anti-humano de ratón (Southern Biotech/9200-05). Las placas se desarrollan mediante el sistema de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) (SeraCare/5120), y la reacción enzimática se detiene con una solución de detención TMB (KPL/50-85-04).

[0096] A los monos *macaca fascicularis* machos se les administra una sola dosis subcutánea (0,3 mg/kg) de Compuesto 2 en PBS (pH 7,4) a un volumen de 0,5 ml/kg. La sangre se extrae de cada animal de manera previa a la dosis y a 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408 y 504 horas después de la dosis para la caracterización

farmacocinética.

[0097] Tabla 12: Parámetros farmacocinéticos individuales y medios después de una dosis única subcutánea de 0,3 mg/kg a monos *macaca fascicularis* machos.

Compuesto (Dosis)	Animal	$t_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (µg/ml)	AUC_{0-inf} (hr*µg/ml)	CL/F (ml/hr/kg)
Compuesto 2 (0,3 mg/kg)	1	118	48	1,96	206	1,45
	2	116	48	2,44	184	1,63
	Media	117	48	2,20	195	1,54

Abreviaturas: AUC_{0-inf} = área bajo la curva desde el tiempo 0 horas hasta el infinito, CL/F = claridad/biodisponibilidad, T_{max} = tiempo hasta la concentración máxima, C_{max} = concentración máxima en plasma observada, $t_{1/2}$ = vida media.

[0098] Los datos en la Tabla 12 muestran que la $t_{1/2}$ en monos se mide a las 117 horas. Esta es una $t_{1/2}$ inesperadamente larga para una molécula de Fc monomérica. Además, el perfil farmacocinético en monos es estable durante un período de tiempo prolongado, lo que sugiere que el perfil farmacocinético del Compuesto 2 en humanos también podría ser estable durante un período de tiempo prolongado en el rango terapéutico para permitir un nivel estable de fármaco en el torrente sanguíneo con una dosis semanal.