

TÍTULO DE LA INVENCION

Proteínas de fusión GDF15 y usos de estas

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a proteínas de fusión GDF15. Particularmente, la
5 invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de
extensión de vida media, un enlazador y una proteína GDF15, ácidos nucleicos y
vectores de expresión que codifican las proteínas de fusión, células recombinantes de
estos y composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión. Se
proporcionan, además, métodos para producir las proteínas de fusión y usar las
10 proteínas de fusión para tratar trastornos metabólicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

GDF15, un miembro de la familia TGF β , es una proteína secretada que
circula en el plasma como un homodímero de 25 KDa. Los niveles plasmáticos de
GDF15 varían entre 150 y 1150 pg/ml en la mayoría de los individuos (Tsai et al., *J*
15 *Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012, 3: 239-243). Los niveles plasmáticos de GDF15
se incrementan en condiciones de lesión, enfermedad cardiovascular y algunos tipos
de cáncer. Esta regulación positiva se piensa sea un mecanismo citoprotector. Los
altos niveles plasmáticos de GDF15 se asocian con pérdida de peso debido a
anorexia y la caquexia en el cáncer y en insuficiencia renal y cardíaca. En un ensayo
20 clínico, GDF15 fue un predictor independiente de resistencia a la insulina en sujetos
obesos, no diabéticos (Kempf et al., *Eur. J. endo.* 2012, 167: 671-678). Un estudio
en gemelos mostró que las diferencias en niveles de GDF15 dentro de pares de
gemelos correlacionaron con las diferencias en BMI dentro de ese par, lo que

sugiere que GDF15 sirve como un regulador a largo plazo de la homeostasis de energía (Tsai et al., *PLoS One*. 2015,10(7):e0133362;

Mientras GDF15 se ha estudiado extensamente como un biomarcador para varios estados cardiovasculares y de otras enfermedades, se ha descrito, además, un rol de protección para GDF15 en la hipertrofia miocárdica y lesión isquémica (Collinson, *Curr. Opin. Cardiol*. 2014, 29: 366-371; Kempf et al., *Nat. Med*. 2011, 17: 581-589; Xu et al., *Circ Res*. 2006, 98:342-50). Se ha demostrado que la GDF15 desempeña un papel importante en la protección contra daño intersticial y renal tubular en modelos de ratón de diabetes tipo 1 y tipo 2 (Mazagova et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2013; 305: F1249-F1264). Se propone que la GDF15 tiene un efecto de protección contra la pérdida relacionada con el envejecimiento, de neuronas motoras y sensoriales y mejora la consiguiente recuperación en daños de nervios periféricos (Strelau et al., *J. Neurosci*. 2009, 29: 13640-13648; Mensching et al., *Cell Tissue Res*. 2012, 350: 225-238). De hecho, se demostró que ratones transgénicos para GDF15 tienen un tiempo de vida más largo que los controles de su misma camada, lo cual puede indicar que esta molécula sirve como un factor de la supervivencia a largo plazo (Wang et al., *Aging*. 2014, 6: 690-700).

Numerosos informes han demostrado la mejora de la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en modelos de ratón durante el tratamiento con la proteína GDF15. Dos cepas independientes de ratones transgénicos que sobreexpresan GDF15 tienen peso corporal y masa grasa disminuidos, así como, además, una mejor tolerancia a la glucosa (Johnen et al., *Nat. Med*. 2007, 13:1333-1340; Macia et al., *PLoS One*. 2012, 7:e34868; Chrysovergis et al., *Int. J. Obesity*.

2014, 38: 1555-1564). Los incrementos en el gasto de energía y del metabolismo oxidativo de todo el cuerpo se informaron en ratones transgénicos para GDF15 (Chrysovergis et al., 2014, *Id.*). Estos se acompañaron por un aumento en la expresión de genes termogénicos en tejido adiposo marrón y un aumento en la
5 expresión de genes lipolíticos en tejido adiposo blanco. Los ratones que carecen del gen GDF15 tienen peso corporal y masa grasa aumentados (Tsai et al., *PLoS One*. 2013, 8(2):e55174). Una fusión con FC de GDF15 se demostró que disminuye el peso corporal y mejora la tolerancia a la glucosa, así como, además, la sensibilidad a la insulina en un modelo de mono cinomólogo obeso cuando se
10 administra semanalmente durante un período de seis semanas (WO 2013/113008).

Los efectos de GDF15 en el peso corporal se piensa que están mediados por la reducción de la ingesta alimenticia y el gasto elevado de energía. La GDF15 puede mejorar el control glicémico mediante mecanismos dependientes e independientes del peso corporal.

15 Juntas, estas observaciones sugieren que aumentar los niveles de GDF15 puede ser beneficioso como una terapia para enfermedades metabólicas. Existe la necesidad en la materia de contar con composiciones a base de GDF15 que puedan usarse para tratar o prevenir enfermedades metabólicas, trastornos, o afecciones.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La invención satisface esta necesidad ya que proporciona proteínas de fusión de GDF15 que demuestran un aumento en la solubilidad/estabilidad y exhiben características que indican que pueden usarse para tratar o prevenir

enfermedades metabólicas, trastornos, o afecciones. Estas características incluyen, por ejemplo, la disminución de peso corporal, aumento de la tolerancia a la glucosa y mejor sensibilidad a la insulina de un sujeto administrado con una proteína de fusión de acuerdo con una modalidad de la invención.

5 En un aspecto general, la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende: (a) una proteína de extensión de vida media, (b) un enlazador y (c) una proteína GDF15, en donde la proteína de fusión se dispone a partir del extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal en el orden (a)- (b)- (c).

 En una modalidad de la invención, la proteína GDF15 es una
10 proteína GDF15 humana, o una variante funcional de esta. En modalidades particulares, la proteína GDF15 comprende una proteína GDF15 madura o variante funcional de esta. En modalidades más particulares, la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 6-11. En otras modalidades
15 particulares, la proteína GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, tal como una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 6-11.

 En una modalidad de la invención, una proteína de extensión de vida media es la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) o una variante
20 funcional de esta. En modalidades particulares, la proteína de extensión de vida media comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: 1. En otras modalidades particulares, la

proteína de extensión de vida media comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1-3.

En una modalidad de la invención, el enlazador es un enlazador flexible. En modalidades particulares, el enlazador flexible contiene la secuencia
5 (GGGGS)_n, en donde n es 2 a 20, preferentemente 4 a 10. En otra modalidad de la invención, el enlazador de la proteína de fusión es un enlazador estructurado. En modalidades particulares, el enlazador estructurado contiene la secuencia (AP)_n o (EAAAK)_n, en donde n es 2 a 20, preferentemente, 4 a 10.

En modalidades de la invención, la proteína de fusión comprende una
10 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-60 o 64-75. En modalidades particulares, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 40, 55-60 y 70. En modalidad más particular de la invención, la proteína de fusión
15 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60.

En otro aspecto general, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto general, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una
20 proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con una célula huésped recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con un método para obtener una proteína de fusión de la invención. El método comprende: (1) cultivar una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión bajo una condición que se produce la proteína de fusión y (2) recuperar la proteína de fusión producida por la célula huésped.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con un estuche que comprende una composición farmacéutica de la invención.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con un método para tratar o prevenir una enfermedad metabólica, trastorno o afección, el método que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una composición farmacéutica de la invención. En una modalidad particular, la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía subcutánea o por vía intravenosa.

de acuerdo con modalidades de la invención, un método para tratar un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardiaca

congestiva, o la artritis reumatoide, en un sujeto que lo necesite, comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:

- 5 5, 25-30, 40, 55-60 y 70 y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad particular, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60 y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 10 Otros aspectos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, que incluye la descripción detallada de la invención y sus modalidades preferidas y de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- El sumario anterior, así como, además, la siguiente descripción
15 detallada de la invención, se entenderán mejor cuando se lea junto con las figuras adjuntas. Debe entenderse que la invención no se limita a las modalidades precisas, mostradas en las figuras.

En las figuras:

- Las Figuras 1A y 1B muestran la estructura cristalina de GDF15, en
20 donde el apareamiento por disulfuros del primer y segundo residuos de cisteína (C1-C2) formó un lazo en el extremo N terminal de la proteína.

La Figura 2 muestra los efectos de la administración subcutánea de proteínas de fusión de acuerdo con modalidades de la invención, p. ej., las

proteínas de fusión FP1 (sec. con núm. de ident.: 60) y 6xHis-FP1 (sec. con núm. de ident.: 26 con una etiqueta de 6xHis unida en el extremo N-terminal), en la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6, se representa la ingesta de alimentos acumulativa en 24 horas después de la administración. Los valores que se

5 muestran dentro de las barras son los % de reducción en comparación con el grupo del vehículo (PBS) $\pm$ SEM; N=8 animales por grupo para todos los grupos, excepto N=9 en el grupo de 16 nmol de FP1/kg. *-p<0,05, en comparación al vehículo; los valores p se calcularon por medio del uso de ANOVA unidireccional y de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

10 La Figura 3 muestra los efectos de la administración subcutánea de FP1 y 6xHis -FP1 (sec. con núm. de ident.: 26 con una etiqueta de 6xHis unida en el extremo N-terminal) en la ingesta de alimentos en ratas Sprague-Dawley, se representa la ingesta de alimentos acumulativa en 48 horas después de la administración. Los valores que se muestran dentro de las barras son los % de

15 reducción en comparación con el grupo del vehículo (PBS) $\pm$ SEM; N=8 animales por grupo. *-p<0,05, en comparación al vehículo; los valores p se calcularon por medio del uso de ANOVA unidireccional y de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 4 muestra el cambio en el peso corporal de ratones obesos inducidos por la dieta (DIO) durante el tratamiento con FP1. Las flechas indican el

20 tiempo (días) de la administración subcutánea después de la dosis inicial (Día 0); N=8 animales por grupo. * - p<0,05, para 1 nmol de FP1/kg en comparación con el grupo del vehículo; # - p<0,05, para 10 nmol de FP1/kg en comparación con el

grupo del vehículo; valores p se calcularon por medio del uso ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Las Figuras 5A y 5B muestran los niveles de glucosa en sangre en ratones DIO, durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) después de 14 días de dosificación de FP1 cada 3 días (q3d), los niveles se expresan como el área bajo la curva. N=8 animales por grupo. * - $p < 0,05$, para 1 nmol de FP1/kg en comparación con el grupo del vehículo; los valores p se calcularon por medio del uso de ANOVA unidireccional y de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 6 muestra los niveles de glucosa en sangre alimentada en ratones DIO durante el tratamiento con FP1. N=8 animales por grupo. * - $p < 0,05$, en comparación al vehículo; valores p se calcularon por medio del uso ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 7 muestra la evaluación del modelo homeostático de 4 horas de ayuno de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones DIO, después de 14 días de tratamiento con FP1. N=8 animales por grupo. * - $p < 0,05$, en comparación al vehículo; los valores p se calcularon por medio del uso de ANOVA unidireccional y de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 8 muestra el cambio en el peso corporal en ratones *ob/ob* durante el tratamiento con FP1 cada 3 días (qd3). Las flechas indican el tiempo (días) de la administración subcutánea después de la dosis inicial (Día 0); N=9 animales por grupo. * - $p < 0,05$, para 10 nmol de FP1/kg en comparación con el grupo del vehículo; # - $p < 0,05$, para 1 nmol de FP1/kg en comparación con el grupo

del vehículo; valores p se calcularon por medio del uso ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 9 muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones *ob/ob* durante el tratamiento con FP1. Las flechas indican el tiempo (días) de la administración subcutánea después de la dosis inicial (Día 0); N=9 animales por grupo. *-p<0,05, para 10 nmol de FP1/kg en comparación con el grupo del vehículo; # - p<0,05, para 1 nmol de FP1/kg en comparación con el grupo del vehículo; valores p se calcularon por medio del uso ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 10 muestra la media ($\pm$ desviación estándar, SD) del perfil tiempo-concentración del fármaco en suero de FP1 después de la administración subcutánea (SC) e intravenosa (IV) de 2 mg/kg en ratones C57Bl/6.

La Figura 11 muestra la media ($\pm$ SD) del perfil tiempo-concentración del fármaco en suero de FP1 después de la administración SC e IV de 2 mg/kg en ratas Sprague-Dawley.

La Figura 12 muestra la media ($\pm$ SD) del perfil tiempo-concentración del fármaco en suero de FP1 después de la administración SC e IV de 1 mg/kg en monos cynomolgus, según se determina por inmunoensayos.

La Figura 13 muestra la concentración en suero (ng/ml) de FP1 como un dímero intacto en el tiempo después de una sola administración IV en monos cynomolgus, según se determina por análisis de LCMS-captura por inmunoafinidad (IA).

La Figura 14 muestra la concentración en suero (ng/ml) de FP1 como un dímero intacto en el tiempo después de una sola administración SC en monos cynomolgus, según se determina por análisis de LCMS-captura por inmovinoafinidad.

La Figura 15 muestra la concentración de FP1, representada como un % de la concentración inicial, después de 0, 4, 24 y 48 horas de incubación *ex vivo* en plasma obtenido a partir de dos sujetos humanos (Sub), según se determina por medio de inmunoensayo.

La Figura 16 muestra la concentración promedio de FP1, representada como un % del tiempo 0, como un dímero intacto después de 0, 4, 24 y 48 horas de incubación *ex vivo* en plasma obtenido a partir de dos sujetos humanos (Sub), según se determina por análisis de LCMS-captura por inmovinoafinidad de la masa intacta.

La Figura 17 muestra la ingesta aguda de alimentos en los ratones macho C57BL6N sin grasa antes y después de la administración de las diversas variantes de delección N-terminal de GDF15. (las sec. con núms. de ident.: 92, 111 y 112 en comparación con la proteína de fusión silvestre sin delección (sec. con núm. de ident.: 26 con una etiqueta de 6xHis unida en el extremo N-terminal). N=8 animales por grupo; *-p<0,05, en comparación al vehículo; valores p se calcularon por medio del uso ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La Figura 18 muestra el efecto de una sola dosis de FP2 en la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6; específicamente, se muestra la ingesta de alimentos acumulativa en 24 horas después de la administración. Los valores que se muestran dentro de las barras son los % de reducción en comparación

con el grupo de PBS (media $\pm$ SEM); N=8 animales por grupo para todos los grupos, excepto N=6 en 6xHis-FP1. **-p<0,01, ***-p<0,001, ****-p<0,0001; Los valores p se calcularon por medio del uso ANOVA bidireccional y la prueba de Dunnetts para comparaciones múltiples.

5 La Figura 19 muestra la ingesta de alimentos acumulativa medida en ratas Sprague-Dawley en 24 horas después de la administración de una sola dosis de FP2. Los valores que se muestran dentro de las barras son los % de reducción en comparación con el grupo de PBS (media $\pm$ SEM); N=8 animales por grupo. ** - p<0,01, los valores p se calcularon por medio del uso de ANOVA
10 bidireccional y de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

 La Figura 20 muestra el cambio porcentual en el peso corporal durante el tratamiento con FP2 q3d en ratones DIO. Las flechas indican el momento de las inyecciones subcutáneas de FP2; N=6 animales por grupo; * - p,0,05, en comparación con el vehículo, por medio del uso de ANOVA
15 bidireccional y prueba de Tukey para comparaciones múltiples;

 Las Figuras 21A y 21B muestran el área bajo la curva (AUC) para los niveles de la concentración de glucosa en sangre durante la prueba OGTT después de 14 días de dosificación q3d de FP2 en ratones DIO. * - p<0,05, mediante ANOVA unidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de
20 Tukey, con el uso de N=8 animales por grupo.

 La Figura 22A muestra los niveles de insulina en plasma durante una OGTT, después de 8 días de dosificación q3d de FP2 en ratones DIO. * - p<0,05, vehículo en comparación con FP2 (0,3 nmol/kg); FP2 (10 nmol/kg); y

Rosiglitazona. # - $p < 0,05$, en comparación con Rosiglitazona (10 mg/kg), con el uso de ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

La Figura 22B muestra el AUC para los niveles de insulina en plasma durante una OGTT, después de 8 días de dosificación q3d de FP2 en ratones DIO. * - $p < 0,05$, en comparación al vehículo; # - $p < 0,05$, en comparación con Rosiglitazona.

La Figura 23 muestra los niveles de glucosa en sangre alimentada, después de 8 días de dosificación q3d de FP2 en ratones DIO. * - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo, con el uso de ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, $n=8$ animales por grupo.

La Figura 24 muestra la HOMA-IR en ayunas después de 14 días de tratamiento con FP2 q3d, seguido de 5 horas de ayuno en el Día 14, en ratones DIO. * - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo, mediante ANOVA unidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para $n=8$ animales por grupo.

La Figura 25 muestra las concentraciones en suero de FP2 después de la administración subcutánea (SC) de 2 mg/kg e intravenosa (IV) de 2 mg/kg en ratones C57Bl/6. Los valores representan media $\pm$ SD ($n=5$ muestras por punto de tiempo).

La Figura 26 muestra las concentraciones en suero de FP2 después de la administración subcutánea (SC) de 2 mg/kg e intravenosa (IV) de 2 mg/kg en ratas Sprague Dawley. $N=5$ muestras por punto de tiempo.

La Figura 27 muestra las concentraciones en plasma de FP2 en monos cynomolgus analizadas mediante inmunoensayo. Los valores representan

la media $\pm$ SD de n=3, excepto n=2 para IV en el día 22 (528 horas). IV = vía intravenosa, SC = vía subcutánea;

La Figura 28 muestra las concentraciones en plasma de FP2 como dímero intacto en monos cynomolgus analizados por LCMS. Los valores
5 representan la media $\pm$ SEM de n=3, excepto n=2 para subcutánea (SC) a las 168 horas, n=1 para SC a las 120 horas y 432 horas y n=1 para IV - Intravenosa a las 168 horas y 432 horas.

La Figura 29 muestra la estabilidad *ex vivo* de FP2 (recuperación porcentual normalizada) durante 48 horas en plasma humano medido por
10 inmunoensayo.

La Figura 30 muestra la estabilidad *ex vivo* de FP2 (recuperación porcentual normalizada) durante 48 horas en plasma humano medido por LC/MS intacta.

La Figura 31 muestra las curvas de respuesta a la concentración para
15 FP2 y el heterodímero HSA-GDF15:GDF15 mediante el uso de ensayos pAKT en células SK-N-As que expresan el receptor GFRAL humano recombinante (N=3).

La Figura 32 muestra ingesta de alimentos diaria (g) antes de y después de una sola dosis de FP1 en monos cynomolgus. * - $p < 0,05$ para 10 mg/kg de FP1 en comparación con vehículo.

20 La Figura 33 muestra el porcentaje de cambio de peso corporal antes de y después de una sola dosis de FP1 en monos cynomolgus. * - $p < 0,05$ para 10 mg/kg de FP1 en comparación con vehículo; # - $p < 0,05$ para 3 mg/kg en comparación con el

vehículo con el uso de ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para $n=8$ animales por grupo.

La Figura 34 muestra ingesta de alimentos diaria (g) antes de y después de una sola dosis de FP2 en monos cynomolgus. * - $p<0,05$, en comparación con el
5 vehículo, con el uso de ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para $n=8$ animales por grupo.

La Figura 35 muestra el porcentaje de cambio de peso corporal antes de y después de una sola dosis de FP2 en monos cynomolgus. * - $p<0,05$, para
10 10 nmol/kg de FP2 en comparación al vehículo, # - $p<0,05$, para 3 nmol/kg de FP2 en comparación al vehículo, & - $p<0,05$, para 1 nmol/kg de FP2 en comparación con el vehículo, con el uso de ANOVA bidireccional para observaciones repetidas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para $n=8$ animales por grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Distintas publicaciones, artículos y patentes se citan o describen en los antecedentes y a lo largo de toda la descripción; cada una de estas referencias se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. La descripción de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o lo similar, que se han incluido en la presente descripción, es para el propósito de proporcionar el contexto para la invención. Tal descripción no es una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos formen parte de la materia anterior con respecto a cualquier invención descrita o reivindicada.

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la materia a la que se dirige la invención. De cualquier otra manera, ciertos términos usados en la presente descripción tienen los significados tal como se establecen en la descripción. Todas las patentes, las solicitudes de patente publicadas y publicaciones mencionadas en la presente descripción se incorporan como referencia ya que se describen detalladamente en la presente descripción. Debe destacarse que, como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende (a) una proteína con extensión de vida media, (b) un enlazador y (c) una proteína GDF15, en donde la proteína de fusión se dispone a partir del extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal en el orden (a)- (b)- (c).

Se encontró que una proteína de fusión de acuerdo con una modalidad de la invención, que comprende una proteína con extensión de vida media, un enlazador y una proteína GDF15, resulta en un aumento de la vida media de la proteína GDF15 y las proteínas de fusión de la invención exhiben los efectos metabólicos que demuestran su idoneidad como agentes terapéuticos para tratar y prevenir enfermedades metabólicas, trastornos o afecciones. Tales efectos incluyen, pero sin limitarse a reducir el peso corporal, aumentar la tolerancia a la glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina, de los animales administrados con las proteínas de fusión.

Como se usa en la presente descripción, el término “proteína de fusión” se refiere a una proteína que tienen dos o más porciones unidas covalentemente entre sí, en donde cada una de las porciones se deriva de diferentes proteínas.

Las proteínas de fusión de acuerdo con modalidades de la invención pueden incluir cualquier proteína GDF15. Como se usa en la presente descripción, el término “proteína GDF15” se refiere a cualquier factor 15 proteico de diferenciación del crecimiento, silvestre, de origen natural, o una variante funcional de este. La proteína GDF15 puede ser de cualquier mamífero, tal como un ser humano u otro mamífero adecuado, tal como un ratón, conejo, rata, cerdo, perro, o un primate. En modalidades particulares, la proteína GDF15 es una proteína GDF15 humana, o una variante funcional de esta. En modalidades preferidas, la proteína GDF15 es una proteína GDF15 madura o una variante funcional de esta.

Como se usa en la presente descripción, el término “proteína GDF15 madura” se refiere a la porción de la pre proproteína de GDF15 que se libera de la

proteína de longitud completa después de la escisión intracelular en el sitio de escisión RXXR de tipo furina. Las proteínas GDF15 maduras se secretan como homodímeros unidos por enlaces disulfuro. En una modalidad de la invención, una proteína madura GDF15, abreviada GDF15(197-308) (sec. con núm. de ident.: 6), contiene

5 aminoácidos 197-308 de una proteína humana GDF15 de longitud completa.

Como se usa en la presente descripción, “variante funcional” se refiere a una variante de una proteína original que tiene sustancial o significativa identidad de secuencia con la proteína original y retiene al menos una de las actividades biológicas de la proteína original. Una variante funcional de una proteína original

10 puede prepararse por medios conocidos en la materia en vista de la presente descripción. Una variante funcional puede incluir una o más modificaciones a la secuencia de aminoácidos de la proteína original. Las modificaciones pueden cambiar las propiedades fisicoquímicas del polipéptido, por ejemplo, mediante mejora de la estabilidad térmica del polipéptido, alteración de la especificidad de

15 sustrato, cambio del pH óptimo y lo similar. Las modificaciones pueden alterar, además, las actividades biológicas de la proteína original, siempre que no destruyan o supriman todas las actividades biológicas de la proteína original.

de acuerdo con modalidades de la invención, una variante funcional de una proteína original comprende una sustitución, preferentemente, una sustitución

20 conservativa de aminoácidos de la proteína original, que no afecta significativamente la actividad biológica de la proteína original. Las sustituciones conservativas incluyen, pero sin limitarse a, sustituciones de aminoácidos dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido

aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

Pueden usarse, además, aminoácidos no naturales o no estándar (tales como 4-

5 hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) para sustituir residuos de aminoácidos estándar en la proteína original.

De acuerdo con otras modalidades de la invención, una variante funcional de una proteína original comprende una delección y/o inserción de uno o más aminoácidos en la proteína original. Por ejemplo, una variante funcional de una
10 proteína GDF15 madura puede incluir una delección y/o inserción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más aminoácidos a la proteína GDF15 madura, preferentemente, una delección de 1 a 30 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína GDF15 madura.

De acuerdo con aún otras modalidades de la invención, una variante
15 funcional de una proteína original comprende una sustitución, preferentemente, una sustitución conservativa de aminoácidos y una delección y/o inserción, preferentemente, una pequeña delección y/o inserción de aminoácidos, en la proteína original.

De acuerdo con modalidades de la invención, una proteína de fusión
20 de la invención comprende una proteína GDF15 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una GDF15 madura, tal como GDF15(197-308) (sec. con núm. de ident.: 6) o una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una GDF15

madura truncada en el extremo N-terminal, tal como GDF15(200-308) (sec. con
núm. de ident.: 7), GDF15 (201-308) (sec. con núm. de ident.: 8), GDF15 (202-308)
(sec. con núm. de ident.: 9), GDF15 (203-308) (sec. con núm. de ident.: 10) o GDF15
(211-308) (sec. con núm. de ident.: 11). La proteína GDF15 puede tener al menos
5 una de sustituciones, inserciones y deleciones con la sec. con núm. de ident.: 6, 7, 8,
9, 10 u 11, siempre que esta mantenga al menos una de las actividades biológicas
de la proteína GDF15, tales como sus efectos sobre la ingesta de alimentos, los
niveles de glucosa en sangre, la resistencia a la insulina y el peso corporal, etc.

En modalidades particulares, una proteína de fusión de la invención
10 comprende una proteína GDF15 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 11, que incluye, pero sin limitarse a la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

Cualquier proteína con extensión de vida media puede usarse en las
proteínas de fusión de acuerdo con modalidades de la invención. Como se usa en
15 la presente descripción, el término “proteína de extensión de vida media” puede
ser cualquier proteína o fragmento de esta que se conoce por extender la vida
media de las proteínas a las que se fusiona. Ejemplos de tales proteínas de
extensión de vida media incluyen, pero sin limitarse a, albúmina sérica humana
(HSA), el dominio del fragmento constante (Fc) de una inmunoglobulina (Ig), o
20 transferrina (Tf). En modalidades de la invención, la proteína de extensión de vida
media comprende HSA o una variante funcional de esta. En modalidades
particulares de la invención, la proteína de extensión de vida media comprende
una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm.

de ident.: 1. En modalidades preferidas de la invención, la proteína de extensión de vida media comprende HSA o variante funcional de esta, en donde el residuo de cisteína en la posición 34 de la HSA se ha reemplazado por serina o alanina.

En modalidades particulares, una proteína de fusión de la invención
5 comprende una proteína de extensión de vida media que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1-3.

Cualquier enlazador puede usarse en las proteínas de fusión de acuerdo con modalidades de la invención. Como se usa en la presente descripción, el término “enlazador” se refiere a una porción enlazante que comprende un enlazador
10 peptídico. Preferentemente, el enlazador ayuda a asegurar el plegamiento correcto, minimiza el impedimento estérico y no interfiere significativamente en la estructura de cada componente funcional dentro de la proteína de fusión. En algunas modalidades de la invención, el enlazador peptídico comprende 2 a 120 aminoácidos. Por ejemplo, el enlazador peptídico comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,
15 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 aminoácidos.

20 En modalidades de la invención, el enlazador aumenta la flexibilidad de los componentes de la proteína de fusión. En modalidades particulares de la invención, el enlazador puede ser un enlazador flexible que comprende la secuencia

(GGGGS)_n, que incluye, pero sin limitarse a, GS-(GGGGS)_n o AS-(GGGGS)_n-GT, en donde n es 2 a 20, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

En otras modalidades de la invención, el enlazador es estructurado.

En modalidades particulares de la invención, el enlazador puede ser un enlazador

5 estructurado que comprende la secuencia (AP)_n o (EAAAK)_n, que incluye, pero sin limitarse a, AS-(AP)_n-GT o AS-(EAAAK)_n-GT, en donde n es 2 a 20, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En otras modalidades de la invención, el enlazador comprende las secuencias (GGGGA)_n, (PGGGS)_n, (AGGGS)_n o GGS-(EGKSSGSGSESKST)_n-GGS en donde n es 2 a 20 aminoácidos.

10 En modalidades de la invención, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 o 64-75. En modalidades particulares, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5,

15 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 y 64-75. En modalidades más particulares de la invención, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 40, 55-56, 55-56, 59-60 y 70. En modalidades más particulares adicionales de la invención, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de

20 ident.: 92, la sec. con núm. de ident.: 60 o la sec. con núm. de ident.: 26. La proteína de fusión puede incluir, además, pequeña(s) extensión(es) en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína, tal como una etiqueta que facilita la purificación, tal como una etiqueta de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

Las proteínas de fusión descritas en la presente descripción pueden caracterizarse o evaluarse por las actividades biológicas de GDF15 que incluyen, pero sin limitarse a los efectos sobre la ingesta de alimentos, las pruebas de tolerancia oral a la glucosa, las mediciones de los niveles de glucosa en sangre, el análisis de la resistencia a la insulina, los cambios en el peso corporal, análisis farmacocinético, análisis toxicocinéticos, análisis de inmunoensayos y de espectrometría de masas del nivel y la estabilidad de proteínas de fusión de longitud completa y análisis de estabilidad *ex vivo* del plasma humano.

La invención proporciona, además, una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención. En modalidades de la invención, la molécula aislada de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 o 64-75. En modalidades particulares, la molécula aislada de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 y 64-75. En modalidades más particulares, la molécula aislada de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 40, 55-56, 59-60 y 70. En modalidades más particulares adicionales, la molécula aislada de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 76-91.

de acuerdo con otras modalidades de la invención, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión puede estar en un vector de expresión. Los vectores de expresión incluyen, pero sin limitarse a, vectores para la expresión de proteínas recombinantes y vectores para el suministro de ácidos nucleicos en un sujeto para la expresión en un tejido del sujeto, tal como los vectores virales. Los ejemplos de vectores virales adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitarse a los vectores de adenovirus, vectores de virus asociados con adenovirus, vectores de lentivirus, etc. El vector puede ser, además, un vector no viral. Los ejemplos de vectores no virales incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, bacteriófagos, etc. El vector puede incluir cualquier elemento para establecer una función convencional de un vector de expresión, por ejemplo, un promotor, un elemento de unión al ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, o un origen de replicación.

De acuerdo con otras modalidades de la invención, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión puede ser optimizada por codones para mejor expresión recombinante de una célula huésped deseada, tal como células de riñón embrionario humano (HEK) o de ovario de hámster chino (CHO), con el uso de métodos conocidos en la materia en vista de la presente descripción.

La invención proporciona, además, una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención. Las células huésped incluyen, pero sin limitarse a, células huésped para la expresión de la proteína recombinante y células huésped para el suministro del ácido nucleico en un sujeto para la expresión en un tejido del

sujeto. Los ejemplos de células huésped adecuadas para su uso con la invención incluyen, pero sin limitarse a las células CHO o HEK.

En otro aspecto general, la invención se relaciona con un método para obtener una proteína de fusión de la invención. En un aspecto general, el método comprende: (1) cultivar una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión bajo una condición que se produce la proteína de fusión y (2) recuperar la proteína de fusión producida por la célula huésped. La proteína de fusión puede purificarse adicionalmente mediante el uso de métodos conocidos en la materia.

En algunas modalidades, la proteína de fusión se expresa en células huésped y se purifica a partir de estas mediante el uso de una combinación de una o más técnicas de purificación estándar, que incluyen, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración y diálisis. Preferentemente, la proteína de fusión se purifica para estar libre de cualesquiera de las proteasas.

La invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona, además, una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención puede comprender un vehículo de suministro para la introducción de la molécula

de ácido nucleico en una célula para la expresión de la proteína de fusión. Los ejemplos de vehículos de suministro de ácido nucleico incluyen liposomas, polímeros biocompatibles, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos, lipoproteínas, polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, envolturas virales artificiales, partículas metálicas y bacterias, virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación usados, típicamente, en la materia los cuales se han descrito para la expresión en una variedad de huéspedes eucariotas.

El portador farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más de excipiente farmacéuticamente aceptable, amortiguador, estabilizador u otros materiales conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de agua, solución salina, amortiguador, agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, así como además combinaciones de estos. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo en las dosificaciones y concentraciones usadas. La naturaleza precisa del portador u otro material puede depender de la vía de administración, p. ej., las vías intramuscular, subcutánea, oral, intravenosa, cutánea, intramucosal (p. ej., por el intestino), intranasal o intraperitoneal. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse, además, solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos

o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Las composiciones para la administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una solución y se colocan, generalmente, en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, tal como una bolsa o frasco de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

De acuerdo con modalidades de la invención, una composición farmacéutica puede comprender uno o más componentes adicionales, tales como otro ingrediente activo.

La invención se relaciona, además, con estuches que comprenden una composición farmacéutica de la invención. Los estuches pueden contener un primer envase que tiene una proteína de fusión seca de la invención y un segundo envase que tiene una solución acuosa para mezclarse con la proteína de fusión seca antes de la administración a un sujeto, o un único envase que contiene una composición farmacéutica líquida de la invención. El estuche puede contener una unidad de administración de una sola dosis o unidades de administración de múltiples dosis de una composición farmacéutica de la invención. El estuche puede incluir, además, una o más jeringas llenadas previamente (p. ej., jeringas con líquido y jeringas Lyo). Un estuche puede comprender, además, instrucciones para el uso de estos. Las instrucciones pueden describir el uso y naturaleza de los materiales incluidos en el estuche y pueden hacerse a la medida del trastorno metabólico preciso que se trata.

La invención se relaciona, además, con el uso de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción para tratar o prevenir una enfermedad metabólica, trastorno o afección, tales como la diabetes tipo 2,

elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardiaca congestiva, o la artritis reumatoide. de acuerdo con modalidades de la invención, un método para tratar o prevenir una enfermedad metabólica, trastorno o afección en un sujeto que necesita el tratamiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una composición farmacéutica de la invención. Cualesquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden usarse en un método de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la invención o composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión.

Como se usa en la presente descripción, “sujeto” significa cualquier animal, particularmente un mamífero, más particularmente, un ser humano, que será o que se ha tratado mediante un método de acuerdo con una modalidad de la invención. El término “mamífero” como usa en la presente descripción, abarca cualquier mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitarse a, vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, primates no humanos (NHP) tales como monos o simios, seres humanos, etc., más particularmente, un ser humano.

Una “enfermedad metabólica, trastorno o afección” se refiere a cualquier trastorno relacionado con el metabolismo anormal. Los ejemplos de enfermedades metabólicas, trastornos o afecciones que pueden tratarse de acuerdo con un método de la invención incluyen, pero sin limitarse a, la diabetes

tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva, o la artritis reumatoide.

Los términos “tratar”, “que se trata” y “tratamiento” como se usan en la presente descripción se refieren a administrar una composición a un sujeto para lograr un resultado clínico o terapéutico deseado en el sujeto. En una modalidad, los términos “tratar”, “que se trata” y “tratamiento” se refieren a administrar una composición farmacéutica de la invención para reducir, aliviar o atrasar la progresión o desarrollo de un trastorno metabólico, tal como diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva, o la artritis reumatoide.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad de un compuesto terapéuticamente activo necesaria para provocar el efecto clínico o biológico deseado. de acuerdo con modalidades de la invención, “una cantidad terapéuticamente efectiva” es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede administrarse en una o más administraciones. En términos de estado de una enfermedad, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar, o retrasar el desarrollo de una enfermedad. de acuerdo con modalidades específicas de la invención, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de una proteína de fusión necesaria para tratar o prevenir una enfermedad metabólica, trastorno o afección, tales como

la diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardiaca congestiva, o la artritis reumatoide.

de acuerdo con modalidades de la invención, una composición

5 farmacéutica de la invención puede administrarse a un sujeto mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia en vista de la presente descripción, tal como mediante vía de administración intramuscular, subcutánea, oral, intravenosa, cutánea, intramucosal (p. ej., por el intestino), intranasal o intraperitoneal. En modalidades particulares, una composición farmacéutica de la invención se administra
10 a un sujeto mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea.

Los parámetros, tales como la cantidad de la dosificación, la frecuencia de administración y duración de la administración de una composición farmacéutica a un sujeto de acuerdo con una modalidad de la invención, no se limitan de ninguna manera particular. Los valores óptimos de esos parámetros pueden depender de una
15 variedad de factores, tales como el sujeto que se va a tratar, la enfermedad metabólica particular que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, etc. y un experto en la materia será capaz de determinar los valores óptimos para esos parámetros con el fin de lograr el resultado clínico o terapéutico deseado. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede administrarse una vez al
20 día, o más de una vez al día, tal como dos veces, tres veces, cuatro veces, etc. Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más de la proteína de fusión, en dependencia de los factores, tales como aquellos mencionados anteriormente.

MODALIDADES

La Modalidad 1 es una proteína de fusión que comprende: (a) una proteína de extensión de vida media, (b) un enlazador y (c) una proteína GDF15; en donde la proteína de fusión se dispone a partir del extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal en el orden (a)- (b)- (c).

La Modalidad 2 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 1, en donde la proteína GDF15 es una proteína GDF15 humana o una variante funcional de esta.

La Modalidad 3 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 1, en donde la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 6-11.

La Modalidad 4 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 1, en donde la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11.

La Modalidad 5 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 4, en donde la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 6-11.

La Modalidad 6 es una proteína de fusión de acuerdo con cualquier Modalidad 1 a 5, en donde la proteína de extensión de vida media comprende albúmina sérica humana (HSA) o una variante funcional de esta.

La Modalidad 7 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 6, en donde la proteína de extensión de vida media comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: 1.

La Modalidad 8 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 7, en donde la proteína de extensión de vida media comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1-3.

La Modalidad 9 es una proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las Modalidades 1 a 8, en donde el enlazador es un enlazante flexible.

La Modalidad 10 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 9, en donde el enlazador comprende la secuencia (GGGGS) n , en donde n es 2 a 20, tal como GS-(GGGGS) $x8$ o AS-(GGGGS) $x8$ -GT.

La Modalidad 11 es una proteína de fusión de acuerdo con cualquier Modalidad 1 a 9, en donde el enlazador es un enlazador estructurado.

La Modalidad 12 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 11, en donde el enlazador comprende la secuencia (AP) n o (EAAAK) n , en donde n es 2 a 20, tal como AS-(AP) n -GT o AS-(EAAAK) n -GT.

La Modalidad 13 es una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-60 o 64-75.

La Modalidad 14 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 13, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-60 y 64-75.

La Modalidad 15 es una proteína de fusión de acuerdo con la Modalidad 14, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 40, 55-60 y 70.

5 La Modalidad 16 es una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las Modalidades 1 a 15.

La Modalidad 17 es una molécula aislada de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 76-91.

La Modalidad 18 es un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la Modalidad 16 o 17.

10 La Modalidad 19 es una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la Modalidad 16 o 17.

La Modalidad 20 es un método para producir la proteína de fusión de una cualquiera de las Modalidades 1 a 15, que comprende: (1) cultivar una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión bajo una condición que se produzca la proteína de fusión; y (2) recuperar la proteína de fusión producida por la célula huésped.

La Modalidad 21 es un método de acuerdo con la Modalidad 20, en donde la etapa de recuperación comprende purificar la proteína de fusión para eliminar proteasas.

20 La Modalidad 22 es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión de una cualquiera de las Modalidades 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La Modalidad 23 es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las Modalidades 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 La modalidad 24 es un estuche que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la Modalidad 22 o 23.

La Modalidad 25 es un método para tratar o prevenir un trastorno metabólico, que comprende administrar a un sujeto con necesidad de este una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de acuerdo con cualquier
10 modalidad 22 y 23.

La Modalidad 26 es un método de acuerdo con la Modalidad 25, en donde el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en la diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la
15 insuficiencia cardíaca congestiva, o la artritis reumatoide.

La Modalidad 27 es un método de acuerdo con la Modalidad 25 o 26, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía subcutánea o por vía intravenosa.

La Modalidad 28 es un método para tratar un trastorno metabólico
20 seleccionado del grupo que consiste en la diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva, o la artritis reumatoide, en un sujeto con necesidad de este, el método comprende

administrar por vía intravenosa o por vía subcutánea al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica. que comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 5, 25-30, 40, 55-60 y 70 y
5 un portador farmacéuticamente aceptable.

La Modalidad 29 es un método para tratar un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en la diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardiaca congestiva,
10 o la artritis reumatoide, en un sujeto con necesidad de este, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica, que comprende una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60 y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 La Modalidad 30 es un método de una cualquiera de las Modalidades 25 a 29, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea.

La Modalidad 31 es una proteína de fusión de una cualquiera de las Modalidades 1 a 15 para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno
20 metabólico seleccionado del grupo que consiste en la diabetes tipo 2, elevados niveles de glucosa, elevados niveles de insulina, la obesidad, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la lesión isquémica del miocardio, la insuficiencia cardiaca congestiva, o la artritis reumatoide.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos de la invención son para ilustrar aún más la naturaleza de la invención. Debe entenderse que los siguientes ejemplos no limitan la invención y que el alcance de la invención debe determinarse mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Diseño de moléculas de fusión que comprenden GDF15 – Efecto de truncamientos de GDF15

Al igual que otros miembros de la familia TGF β , GDF15 se sintetiza como una pre proproteína que forma un dímero en el retículo endoplasmático y experimenta escisión por furina para producir GDF15 secretada madura (aminoácidos 197-308). El homodímero de GDF15 maduro secretado es de aproximadamente 25k Daltons y cada monómero tiene el potencial para formar hasta 4 enlaces disulfuro intramoleculares con un solo disulfuro intermolecular lo que une los componentes del homodímero.

La estructura cristalina de GDF15 se determinó en la invención y se ilustra en las Figuras 1A y 1B. La estructura cristalina muestra que el extremo C-terminal de GDF15 madura se sepulta en la interfase del dímero, mientras que el extremo N-terminal está expuesto. Este extremo expuesto permite el enlace de las proteínas de fusión, tal como las proteínas de extensión de vida media, al extremo N-terminal de GDF15.

La estructura cristalina representa, además, el nuevo patrón de apareamiento por disulfuros de residuos de cisteína de GDF15. Mientras que TGF β 1 tiene apareamientos C1-C3 y C2-C7, (es decir, apareamiento entre su

primero y tercero residuos de cisteína, así como, además, entre su segundo y séptimo residuos de cisteína), GDF15 tiene apareamientos C1-C2 y C3-C7 (ver Figuras 1A y 1B). Este apareamiento único por disulfuros resulta en un lazo formado por el apareamiento C1-C2 que se localiza en el extremo N-terminal de la proteína y alejado del nudo de cisteínas que contiene otros enlaces disulfuro. La estructura predice que el extremo N-terminal de GDF15 puede no ser crítico para la formación del dímero o para el plegamiento general de la proteína y que GDF15 y las moléculas de fusión del extremo N-terminal de esta pueden ser tolerables con deleciones en el extremo N-terminal que supriman C1 y C2, residuos dentro del lazo C1-C2, o incluso residuos del extremo C-terminal a C2.

Ejemplo 2: Diseño de moléculas de fusión que comprenden GDF15 – Efecto del enlazador

Se evaluaron diferentes enlazadores entre la molécula de HSA y molécula de GDF15. Se evaluaron ambos enlazadores flexibles, el enlazador que contienen la secuencia (GGGGS)_n y el estructurado, que contienen la secuencia (AP)_n o (EAAAK)_n, en donde n es 2 a 20.

Las proteínas de fusión que comprenden los distintos enlazadores se compararon para sus propiedades biofísicas, su efecto sobre la eficacia de la ingesta de alimentos en ratones sin grasa, sus valores farmacocinéticos (PK) en ratón y su estabilidad *ex vivo* en la sangre humana. Los resultados de las variantes de enlazadores probados se muestran en la Tabla 1. La molécula que comprende la sec. con núm. de ident.: 31, que contenía el enlazador (EAAAK)₈,

mostró agregación mediante HPLC. Las restantes siete variantes de enlazadores en la Tabla 1 no mostraron agregación.

Tabla 1: Resumen del análisis de variantes de enlazadores

Sec. con núm. de ident.*	Enlazador de	Agregación	Buena PK en ratones (WT)	Estabilidad ex vivo en sangre humana
25	AS(GGGGS) ₂ GT	No	Sí	Sí
5	GS(GGGGS) ₄	No	Sí	Sí
26	AS(GGGGS) ₈ GT	No	Sí	Sí
27	AS(AP) ₅ GT	No	Sí	Sí
28	AS(AP) ₁₀ GT	No	Sí	Sí
29	AS(AP) ₂₀ GT	No	Sí	Sí
30	AS(EAAAK) ₄ GT	No	Sí	Sí
31	AS(EAAAK) ₈ GT	SÍ	No probado	No probado

*- se unió etiqueta de 6xHis al extremo N-terminal para el propósito de purificación

Se evaluó, además, la estabilidad del enlazador para estas variantes mediante estudios *in vivo* en ratones y mediante estudios de estabilidad *ex vivo* en muestras de sangre completa y de plasma de humano. Se usaron para analizar los resultados de estos estudios dos formas de detección. Se usó un inmunoensayo con captura de anti-GDF15 y pares de anticuerpos de detección anti-HSA para evaluar cómo era el enlazador intacto por medición de la presencia de ambas moléculas en cualquier lado del enlazador. Se analizó un amplio panorama de la integridad de la molécula completa mediante análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) con el uso de diferentes secuencias de péptidos sustitutos tanto de GDF15 como de HSA. El inmunoensayo demostró un perfil PK estable para todas

las variantes de enlazadores y no se observó ninguna pérdida de concentración de la muestra de plasma adicionada para ninguna de las variantes de enlazadores, durante 48 horas. Los resultados de LC-MS fueron consistentes con el inmunoensayo que muestra que los péptidos sustitutos de diferentes partes de las moléculas de HSA y de GDF15 estaban intactos. El perfil PK de las variantes de enlazadores analizado mediante LC-MS, con el uso de péptidos sustitutos, mostró una tendencia similar para diferentes variantes de enlazadores, en donde todos tuvieron niveles detectables en el día 7. Todas las variantes en la Tabla 1, excepto la sec. con núm. de ident.: 31, tuvieron propiedades biofísicas y valores PK deseables.

Las variantes de enlazadores se evaluaron para determinar su actividad *in vivo* mediante realización de estudios de la ingesta de alimentos en ratones sin grasa. La Tabla 2 muestra la influencia de las variantes de enlazadores en la eficacia de la proteína de fusión en la disminución de la ingesta de alimentos. Se produjo una clara influencia del enlazador en la eficacia. Con respecto a enlazadores (GGGGS)_n flexibles, un aumento en la longitud del enlazador de 2 a 4 a 8, incrementó dramáticamente la eficacia de la proteína de fusión. Para enlazadores (AP)_n más rígidos, la tendencia fue menos obvia, lo que sugiere que el grado de libertad de la molécula de GDF15 dentro de la proteína de fusión, juega un rol crítico en su eficacia.

Tabla 2: Efecto del enlazador sobre la eficacia *in vivo* de las proteínas de fusión HSA-GDF15 en ratones sin grasa

Sec. con núm. de ident.*	Enlazador	% de disminución en la ingesta de alimentos (media)
25	AS(GGGGS) ₂ GT	28,8
5	GS(GGGGS) ₄	40,5
26	AS(GGGGS) ₈ GT	60,7

Sec. con núm. de ident.*	Enlazador	% de disminución en la ingesta de alimentos (media)
27	AS(AP) ₅ GT	48,2
28	AS(AP) ₁₀ GT	66,2
29	AS(AP) ₂₀ GT	55,1
30	AS(EAAAK) ₄ GT	51,9

5 *- se unió etiqueta de 6xHis al extremo N-terminal para el propósito de purificación

Ejemplo 3: Diseño de moléculas de fusión que comprenden

GDF15 – Efecto de mutaciones de HSA

Se diseñaron proteínas recombinantes con la proteína de extensión de vida media de albúmina sérica humana fusionada al extremo N-terminal de GDF15 a través de un enlazador. Este diseño debe tener en cuenta la interfase de dimerización de GDF15 para permanecer inmutable y tener en cuenta la formación de los enlaces disulfuro nativos intracatenarios, lo que resulta en un homodímero de GDF15 con fusión de HSA extendido a partir de cada brazo de GDF15. Con este enfoque, se requiere solamente un solo gen para generar el homodímero HSA-GDF15.

15 La proteína albúmina sérica humana nativa contiene 35 residuos de cisteína (Cys, C) que forman 17 enlaces disulfuro, con el residuo Cys-34, que es la única cisteína libre en la molécula. Esta Cys-34 libre se ha demostrado que funciona como un depurador de radicales libres, mediante captura de múltiples especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Esta Cys libre se mutó así, para minimizar el riesgo de heterogeneidad debido a la oxidación.

La cisteína libre en la posición 34 de la HSA se mutó ya sea a serina o alanina y se analizaron las moléculas de fusión de GDF15, lo mismo con una mutación HSA (C34S) como una HSA (C34A). Ambas moléculas se purificaron por

medio del uso de un método de purificación de tres etapas: (i) cromatografía de intercambio iónico, (ii) cromatografía de interacción hidrofóbica y (iii) cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando se generaron, primeramente, el análisis por HPLC mostró que ambas moléculas estaban puras y libres de agregación (Tabla 3).

Sin embargo, dos semanas después de su generación, la proteína de fusión que contiene la mutación HSA (C34A) (que comprende la sec. con núm. de ident.: 48) mostró agregación por medio de HPLC, mientras que la proteína de fusión que contiene la mutación HSA (C34S) (la sec. con núm. de ident.: 40) permaneció libre de agregación después de cuatro semanas.

Tabla 3: La influencia de la HSA C34 mutante sobre la agregación de la proteína de fusión

Sec. con núm. de ident.	Mutación de HSA	% de agregación cuando se purifica	% de agregación 2 semanas después de la purificación
40	C34S	0	0
48	C34A	0	33,29

Ejemplo 4: Propensión a la escisión con proteasas en GDF15

Se observó por los inventores que el residuo de arginina en la posición 198 del aminoácido de GDF15 (R198), es susceptible a la degradación por proteasas dentro de las moléculas de fusión HSA-GDF15. Esa degradación resulta en una población heterogénea y es indeseable para composiciones terapéuticas. Puede impedirse la escisión mediante un cóctel inhibidor de proteasas. Se investigaron los métodos de purificación para la eliminación de proteasas. La Tabla 4 enumera los dos tipos de columnas de afinidad de HSA que se probaron para la purificación de

proteínas de fusión HSA-GDF15, según se midió por medio de HPLC. En el momento de la purificación, las proteínas de fusión HSA-GDF15 purificadas por ambos métodos estaban 100 % puras e intactas. A bajas concentraciones (2-5 mg/ml), las proteínas purificadas por ambos métodos permanecieron intactas durante todo el período de la prueba de 4 semanas. Sin embargo, a altas concentraciones (40-50 mg/ml), únicamente la resina para HSA a base de anticuerpos (CaptureSelect), produjo proteínas libres de proteasas que permanecen intactas durante todo el período de la prueba de 4 semanas. La resina a base de ligando de HSA (Albupure) generó proteínas que estaban intactas inicialmente, pero mostró degradación a través del tiempo cuando se almacena a altas concentraciones. La adición de un cóctel inhibidor de proteasas (PI) y EDTA detuvo completamente la degradación de la alta concentración de proteína de fusión HSA-GDF15 purificada en lotes mediante el uso de la resina Albupure. Así, el método de purificación desempeña un rol crítico en la generación de una composición terapéutica estable. No se observó degradación correspondiente *in vivo* o *ex vivo*, lo que sugiere que una vez que la composición terapéutica se ha hecho libre de proteasas, la degradación de las proteínas de fusión no es un problema *in vivo*. Por lo tanto, los métodos de purificación que pueden eliminar efectivamente las proteasas potenciales durante la producción, tales como aquellos que usan una resina CaptureSelect, son cruciales para fabricar exitosamente agentes terapéuticos de GDF15, que sean homogéneos, intactos y estables.

Tabla 4: La escisión por proteasas de las proteínas de fusión HSA-GDF15 pueden eliminarse por métodos de purificación de la muestra

Condición			% de población degradada de HSA-GDF15 (Sec. con núm. de ident. 60)				
Concentración	Resina	+PI /EDTA	SEMANA 0	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4
Baja	Capture Select	No	0	0	0	0	0
Baja	Albupure	No	0	0	0	0	0
Alta	Capture Select	No	0	0	0	0	0
Alta	Albupure	No	0	3,04	9,47	11,57	13,89
Alta	Capture Select	Sí	0	0	0	0	0
Alta	Albupure	Sí	0	0	0	0	0

Ejemplo 5: Variantes de delección del extremo N-terminal de GDF15

La estructura cristalina de GDF15 representada en las Figuras 1A y 1B predice que el extremo N-terminal de GDF15, involucrado en las variantes de delección, no es crítico para la formación de dímeros y el plegamiento general de la proteína. Esto predice, además, que tales delecciones en el extremo N-terminal no deberían afectar cualquier interacción potencial con el receptor. Las proteínas de fusión HSA-GDF15 que comprenden diversas delecciones del extremo N terminal de GDF15, se probaron para la actividad *in vivo*.

Las variantes de delección del extremo N-terminal de GDF15 se diseñaron para eliminar el sitio de escisión por proteasas en GDF15 (R198). Inmediatamente a continuación del residuo R198, existe un sitio potencial de desamidación en los residuos N199 - G200 y la desamidación del sustrato tampoco es propicio en composiciones terapéuticas. Las delecciones en el extremo N-terminal de GDF15, pueden eliminar simultáneamente, tanto el sitio de escisión proteolítica como los sitios de desamidación. Las variantes de delección de GDF15 resultantes que se

incorporaron dentro de proteínas de fusión con HSA incluyeron GDF15 (201 - 308; Sec. con núm. de ident.: 8), GDF15 (202 - 308; Sec. con núm. de ident.: 9) y GDF15 (211 - 308; Sec. con núm. de ident.: 11). Los estudios *in vivo* en ratones mostraron que las variantes de delección del extremo N-terminal de GDF15 son aún activas en la reducción de la ingesta de alimentos (Figura 17). Los resultados experimentales confirmaron que tales variantes de delección del extremo N-terminal de GDF15 se expresan adecuadamente, forman dímeros apropiados y son activos *in vivo*.

Ejemplo 6: Mutantes inactivos de GDF15

La Tabla 5 enumera doce mutantes de GDF15 que se realizaron para eliminar GDF15 actividad *in vivo* funcional e identificar el epítipo de GDF15. Los mutantes incluyen cinco mutantes sencillos, dos mutantes dobles y cinco mutantes triple. Las proteínas de fusión HSA-GDF15 que comprenden estas mutaciones se caracterizaron por sus propiedades biofísicas y actividades (Tabla 5). De los 12 mutantes, uno no se expresó y cuatro formaron agregados con el paso del tiempo, lo que indica que las mutaciones interfirieron en el plegamiento de la proteína y las propiedades biofísicas. De los siete mutantes restantes, cuatro de ellos contenían una sola mutación de GDF15 y estos mutantes se probaron en ratones para la reducción de la ingesta de alimentos en comparación con el tipo silvestre. Tres de los mutantes sencillos (I89R, I89W y W32A) perdieron la actividad *in vivo*, mientras que el mutante restante (Q60W) es tan activo como el tipo silvestre. Estos resultados indicaron que la mutación I89R, I89W o W32A interfiere en la interacción del receptor/correceptor con GDF15, lo que sugiere que los epítipos funcionales de GDF15 son residuos alrededor de I89 y W32. La numeración de la

mutación se basa en el GDF15 maduro presente en la proteína de fusión, p. ej., “1” se refiere al 1.^{er} aminoácido del GDF15 maduro (sec. con núm. de ident.: 6) y “89” se refiere al 89.º aminoácido de la proteína GDF15 madura.

Tabla 5: Resumen de las propiedades biofísicas y actividades de las

5 proteínas de fusión que comprenden mutantes de GDF15

Sec. con núm. de ident.	Mutaciones en GDF15	Propiedades biofísicas	Actividades
5	Tipo silvestre	Se expresa bien, estable	Actividad de tipo silvestre
64	I89R	Se expresa bien, estable	Pérdida completa de la actividad
65	I89W	Se expresa bien, estable	Pérdida completa de la actividad
66	L34A, S35A, R37A	Se expresa bien, estable	
67	V87A, I89A, L98A	Se expresa bien, inestable	
68	L34A, S35A, I89A	Se expresa bien, estable	
69	V87A, I89A	Se expresa bien, estable	
70	Q60W	Se expresa bien, estable	Tan activo como el tipo silvestre
71	W32A	Se expresa bien, estable	Pérdida completa de la actividad
72	W29A	Se expresa bien, inestable	
73	Q60A, S64A, R67A	Se expresa bien, inestable	
74	W29A, Q60A, I61A	No se expresa	
75	W29A, W32A	Se expresa bien, inestable	

*- se unió etiqueta de 6xHis al extremo N-terminal para el propósito de purificación

Ejemplo 7: Métodos de expresión y purificación

Expresión

Para la expresión de 20 ml y mayor, la expresión se realizó con el uso de células HEK Expi293™ cultivadas en medio de expresión Expi293™. Las células se cultivaron a 37 °C mientras se agitaban a 125 rpm con 8 % de CO₂. Las células se transfectaron a $2,5 \times 10^6$ células por ml, con el uso del estuche de expresión Expi293™. Por cada litro de células transfectadas, se diluyó 1 mg de ADN total en 25 ml de Opti-MEM y se diluyó 2,6 ml del reactivo Expi293™ en 25 ml de Opti-MEM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN diluido y el reactivo Expi293 diluido se combinaron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El complejo de ADN se adicionó después a las células. Las células se colocaron en el incubador de agitación durante la noche. El día después de la transfección, 5 ml del potenciador 1 del estuche se diluyó en 50 ml de potenciador 2 del estuche y el volumen total de los dos potenciadores se adicionó a las células. Las células transfectadas se colocaron de nuevo en el incubador durante 4 días hasta que se cosecharon. Las células se concentraron por centrifugación a 6000 g durante 30 minutos y después se filtraron con un filtro de 0,2 µm antes de la etapa de purificación.

La expresión se completó, además, en células CHO. El plásmido se purificó y se caracterizó. Antes de la transfección, 1 alícuota de 200 µg de plásmido de ADN que contiene la región codificante de HSA-GDF15 se linealizó por digestión con enzimas de restricción con Acl I. La digestión con la endonucleasa de restricción asegura la eliminación del gen de resistencia a la ampicilina. Dos

alícuotas de ADN 15 µg linealizado se transfectaron en dos colecciones de 1×10^7 células CHO (designado como colección de transfección A y B) mediante el uso del electromanipulador de células BTX ECM 830 (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Las células se electroporaron 3 veces a 250 voltios con pulsos de duración de 15 milisegundos e intervalos de pulsos de 5 segundos en cubeta de abertura de 4 mm. Las células transfectadas se transfirieron a MACH-1 + L-glutamina en un matraz de agitación y se incubaron durante 1 día. La colección de transfección A y la colección de transfección B se centrifugaron, se resuspendieron en MACH-1 + MSX y se transfirieron a los matraces de agitación para incubar durante 6 días. Las células transfectadas que producen proteína de fusión HSA de la colección de transfección A y de colección de transfección B se combinaron y se sembraron en placas en metilcelulosa en el día 8 posterior a la electroporación.

Purificación

Se usó la cromatografía de exclusión por tamaño y dos etapas de purificación con el uso de la resina CaptureSelect. Los sobrenadantes celulares de las células Expi293™ transfectadas temporalmente, se cargaron sobre una columna CaptureSelect para HSA (PBS, pH 7,2) preequilibrada (matriz de afinidad CaptureSelect para albúmina humana de ThermoFisher Scientific) a una capacidad aproximada de 10 mg de proteína por ml de resina. Después de cargar, las proteínas no unidas se eliminaron por lavado de la columna con 10 volúmenes de columna (CV) de PBS, pH 7,2. La HSA-GDF15 que se unió a la columna se eluyó con 10 CV de MgCl_2 2 M en 20 mM de Tris, pH 7,0. Las fracciones pico se agruparon, se filtraron (0,2 µ) y se dializaron contra PBS pH 7,2 a 4 °C. Después

de la diálisis, la proteína se filtró (0,2 μ) nuevamente y se concentró hasta un volumen apropiado antes de cargarla sobre una columna 26/60 superdex 200 (GE Healthcare). Las fracciones de proteínas que eluyeron de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con alta pureza (determinada por SDS-PAGE) se combinaron. La concentración de proteína se determinó mediante la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro BioTek Synergy HTTM. La calidad de las proteínas purificadas se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño (sistema HPLC Dionex, SE-HPLC). Los niveles de endotoxina se midieron con el uso de un ensayo LAL (Pyrotell®-T, Associates de Cape Cod).

Se usó, además, la purificación en dos etapas con el uso de la resina Albupure y SEC. Las proteínas de fusión HSA-GDF15 se purificaron a temperatura ambiente con el uso de la resina AlbuPure (ProMetic Biosciences Ltd), que usa un ligando sintético de triazina inmovilizado para unirse selectivamente a HSA. Los sobrenadantes de expresión se aplicaron a la resina AlbuPure. Después, la resina se lavó, primero con 4 CV de PBS pH 7,2 seguido por 4 CV de Tris pH 8,0 50 mM, amortiguador de NaCl 150 mM. La HSA-GDF15 que se unió a la columna se eluyó con 4 CV de amortiguador de PBS pH 7,2 que contenía octanoato de Na 100 mM. Las fracciones que contienen proteína se concentraron hasta un volumen de 10 ml por medio del uso de un gel concentrador dinámico para límite de peso molecular de 30,000 kDa (Amicon) y después se aplicó a una columna 26/60 Superdex S200pg (GE) que se equilibró en amortiguador de PBS pH 7,2. Las fracciones de la SEC que contenían el homodímero HSA-GDF15 se identificaron mediante SDS-

PAGE y se combinaron para el análisis. Las purezas de las proteínas se evaluaron por SDS-PAGE y SE-HPLC.

Los Ejemplos 8-14 y 19 implican la caracterización de una proteína de fusión ilustrativa de la invención, que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60. Esta proteína de fusión es una proteína completamente recombinante que existe como un homodímero de una fusión de HSA con el GDF15 humano maduro, a través de un enlazador de 42 aminoácidos que consiste en residuos de glicina y serina, GS-(GGGS)₈. El peso molecular previsto de esta proteína de fusión es 162.696 Daltons y la única cisteína libre nativa en la posición 34 de HSA se ha mutado a serina. Esta proteína de fusión HSA-GDF15 particular se denominará simplemente como “FP1” en los siguientes ejemplos, para simplificar. Una variante de FP1 con etiqueta de 6xHis (6xHis-FP1, sec. con núm. de ident.: 26), que contiene un enlazador AS-(GGGS)₈-GT, se usó para la comparación en algunos de los ejemplos que siguen.

Ejemplo 8: Efectos de FP1 sobre la ingesta de alimentos de ratones C57Bl/6

El objetivo de este experimento fue demostrar el efecto de dosis-respuesta de FP1 en la inhibición de la ingesta de alimentos en ratones C57Bl/6.

Los ratones macho C57Bl/6 se aclimataron durante un mínimo de 72 horas en jaulas BioDAQ. Los ratones después se agruparon en base a la ingesta de alimentos en las 24 horas previas en seis grupos de ocho. Entre 4:00 y 5:00 pm, los animales se pesaron y se dosificaron con el vehículo o una composición que comprende FP1 a través de inyección subcutánea. El cambio en el peso de los

alimentos para cada jaula se registró continuamente por el sistema BioDAQ durante un período de 48 horas después de las inyecciones. Se usó 6xHis-FP1 para la comparación en este estudio.

Los resultados (Figura 2 y la Tabla 6) se expresaron como un promedio de la ingesta de alimentos acumulativa para un intervalo dado de tiempo. Los resultados indicaron que la administración subcutánea de FP1 a ratones C57BL/6 inhibió significativamente la ingesta de alimentos con respecto a los animales tratados con el vehículo, en todas las dosis y puntos de tiempo probados. 6xHis-FP1 redujo la ingesta de alimentos en la dosis de 8 nmol/kg.

Tabla 6: Efectos de la administración subcutánea de FP1 en la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6; Se muestra la ingesta de alimentos acumulativa en 12, 24 y 48 horas después de la administración

Ingesta de alimentos acumulativa (g)			
Tratamiento	12 horas	24 horas	48 horas
PBS	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,1	8,4 ± 0,3
FP1, 1 nmol/kg	2,9 ± 0,1*	3,4 ± 0,2**	7,0 ± 0,3**
FP1, 4 nmol/kg	2,3 ± 0,2****	3,1 ± 0,1****	6,6 ± 0,3***
FP1, 8 nmol/kg	2,1 ± 0,2****	3,2 ± 0,1***	6,4 ± 0,2****
FP1, 16 nmol/kg	1,7 ± 0,2****	2,7 ± 0,2****	6,2 ± 0,3****
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	1,8 ± 0,2****	2,6 ± 0,2****	6,0 ± 0,2****

Los datos se expresan como la media ± SEM.

* $p \leq 0,05$, en comparación con PBS; ** $p \leq 0,01$, en comparación con PBS;

*** $p \leq 0,001$, en comparación con PBS; **** $p \leq 0,0001$, en comparación con PBS

Prueba ANOVA unidireccional-prueba de comparaciones múltiples de

Tukey; $n=8$ /grupo

Ejemplo 9: Efectos de FP1 sobre la ingesta de alimentos en ratas Sprague Dawley

El objetivo de este experimento fue demostrar el efecto de dosis-respuesta de FP1 en la inhibición de la ingesta de alimentos en ratas Sprague Dawley.

5 Las ratas macho Sprague-Dawley se aclimataron durante un mínimo de 72 horas en jaulas BioDAQ. Las ratas después se agruparon en base a la ingesta de alimentos en las 24 horas previas en seis grupos de ocho. Entre 4:00 y 5:00 pm, los animales se pesaron y se dosificaron con el vehículo o una composición que comprende la proteína de fusión a través de inyección subcutánea. El cambio en el peso de los alimentos para cada jaula se registró
10 continuamente por el sistema BioDAQ, durante un período de 48 horas después de las inyecciones. Se usó 6xHis-FP1 para la comparación en este estudio.

Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Tabla 7. La administración subcutánea de FP1 inhibió la ingesta de alimentos en dosis de
15 2,5 nmol/kg y de 10 nmol/kg en comparación con los animales tratados con el vehículo. La inhibición alcanzó la significancia estadística solamente con la dosis mayor probada (10 nmol/kg) a 24 y 48 horas después de la administración. FP1 la redujo la ingesta de alimentos en la dosis de 8 nmol/kg y el efecto fue significativo en 24 y 48 horas.

20 Tabla 7: Efectos de la administración subcutánea de FP1 sobre la ingesta de alimentos en ratas macho Sprague-Dawley; Se muestra la ingesta de alimentos acumulativa en 12, 24 y 48 horas después de la administración

Ingesta de alimentos acumulativa (g)			
Tratamiento	12 horas	24 horas	48 horas
PBS	20,6 ± 1,3	25,3 ± 1,3	49,1 ± 2,1
FP1, 0,1 nmol/kg	23,3 ± 1,4	26,9 ± 0,8	52,8 ± 1,3
FP1, 0,5 nmol/kg	22,6 ± 1,7	25,1 ± 1,0	48,3 ± 1,8
FP1, 2,5 nmol/kg	20,0 ± 1,4	22,0 ± 1,0	44,6 ± 1,4
FP1, 10 nmol/kg	18,7 ± 0,9	19,9 ± 1,0*	39,9 ± 2,3*
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	17,0 ± 1,5	18,8 ± 1,4**	38,4 ± 2,5**

Los datos se expresan como la media ± SEM.

* $p \leq 0,05$, en comparación con PBS; ** $p \leq 0,01$, en comparación con PBS

Prueba ANOVA unidireccional-prueba de comparaciones múltiples de

Tukey; $n=8$ /grupo

Ejemplo 10: Efectos de FP1 en la homeostasis de la glucosa y en el peso corporal en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO)

El objetivo de este experimento fue evaluar los efectos de FP1 en la ingesta de alimentos, peso corporal y la homeostasis de la glucosa a lo largo de dos semanas de tratamiento en ratones C57Bl/6 DIO.

Los ratones macho DIO se pesaron y se dosificó FP1 por vía subcutánea, 2 ml/kg cada tres días (q3d) en el Día 0, 3, 6, 9 y 12. Los grupos de tratamiento del vehículo y de rosiglitazona se dosificaron con PBS en un régimen similar. La rosiglitazona de control se proporcionó en la dieta a 0,015 % ad libitum. Se registraron diariamente los pesos de los alimentos y de los ratones. La glucosa se midió por medio del uso de un glucómetro (One Touch®Ultra®, Lifescan, Milpitas, CA). La masa de grasa y la magra se cuantificó en ratones conscientes por NMR de dominio del tiempo (TD-NMR) con el uso de Bruker Mini-Spec LF110. Para una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT), los ratones

se mantuvieron en ayuno durante 4 horas. La glucosa sanguínea se midió a través de tijeretazo en la cola a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración por sonda oral de 2 g/kg de glucosa en 10 ml/kg. La insulina se midió a 0, 30 y 90 minutos después de la administración de glucosa.

5 Al final del estudio, los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y se recolectó una muestra de sangre terminal. El suero se colocó en una placa de 96 pocillos sobre hielo húmedo y, después, se almacenó a -80 °C. El hígado se extrajo, y el contenido de grasa en relación con la masa total de las secciones de hígado se evaluó mediante el uso de TD-NMR con el Bruker
10 MiniSpec mq60 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La evaluación del modelo homeostático en ayunas de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó en base al producto de glucosa en ayunas (en mg/dl) e insulina (en mU/l) dividido entre un factor de 405.

El tratamiento de los ratones DIO con FP1 q3d a 1 nmol/kg y
15 10 nmol/kg, redujo el peso corporal (Tabla 8) y la ingesta de alimentos (Tabla 9). Las reducciones alcanzaron la significancia estadística solamente en ciertos puntos de tiempo, como se describe a continuación.

FP1 disminuyó el peso corporal en dosis de 1 (desde el día 2 al 14) y 10 nmol/kg (desde el día 1 al 14) en ratones DIO (Tabla 8 y Figura 4). Una reducción
20 significativa en la ingesta de alimentos se observó en los días 1 y 2 del estudio a la dosis de 1 nmol/kg y en los días 1, 8 y 9 a la dosis de 10 nmol/kg (Tabla 9).

Tabla 8: Cambio de peso corporal (% de inicio) durante el tratamiento con FP1 en ratones DIO

Tratamiento Día	Vehículo n/a	FP1 (nmol/kg)			Rosiglitazona 10 mpk/día
		0,1	1	10	
-2	0,1 ± 0,2	-0,1 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2
-1	-0,8 ± 0,3	-0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,3	-0,3 ± 0,4	-0,9 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,1 ± 0,2	-0,1 ± 0,4	-1,5 ± 0,5	-2,8 ± 0,4*	1,9 ± 0,2
2	0,0 ± 0,3	-0,8 ± 0,5	-3,2 ± 0,4*	-3,1 ± 0,5*	2,2 ± 0,5
3	-0,2 ± 0,4	-0,4 ± 0,4	-3,2 ± 0,6*	-4,0 ± 0,7*	2,6 ± 0,5
4	-0,4 ± 0,5	-0,7 ± 0,5	-3,8 ± 0,6*	-4,4 ± 0,8*	3,0 ± 0,5*
5	-0,5 ± 0,4	-1,0 ± 0,3	-4,0 ± 0,5*	-4,6 ± 0,9*	3,8 ± 0,6*
6	-0,4 ± 0,6	-0,5 ± 0,5	-3,8 ± 0,4*	-5,6 ± 0,9*	4,0 ± 0,7*
7	-0,3 ± 0,5	-0,5 ± 0,5	-4,3 ± 0,6*	-6,1 ± 0,9*	5,5 ± 0,8*
8	-0,6 ± 0,5	-0,5 ± 0,5	-4,2 ± 0,6*	-6,7 ± 1,1*	6,1 ± 0,9*
9	-0,4 ± 0,5	-0,2 ± 0,5	-4,5 ± 0,6*	-7,2 ± 1,2*	7,0 ± 1,0*
10	-0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	-4,4 ± 0,8*	-7,8 ± 1,2*	7,8 ± 1,1*
11	-0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,4	-4,4 ± 0,8*	-7,9 ± 1,4*	8,2 ± 1,2*
12	-0,8 ± 0,6	0,8 ± 0,5	-4,3 ± 1,0*	-7,9 ± 1,5*	8,5 ± 1,2*
13	-0,8 ± 0,6	0,5 ± 0,5	-3,9 ± 0,9*	-8,7 ± 1,6*	8,6 ± 1,3*
14	-1,7 ± 0,6	-0,4 ± 0,5	-4,6 ± 1,0*	-9,0 ± 1,7*	7,6 ± 1,3*
Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.					
* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.					

Tabla 9: Ingesta de alimentos diaria (g) durante el tratamiento con

FP1 en ratones DIO

Tratamiento Día	Vehículo n/a	FP1 (nmol/kg)			Rosiglitazona 10 mpk/día
		0,1	1	10	
-2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
0	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1
1	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2*	1,5 ± 0,1*	3,6 ± 0,1*
2	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1*	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,2*
3	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1*
4	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1*

5	5	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,7 ± 0,2*
	6	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2*
	7	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,8 ± 0,2*
	8	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*
	9	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2*	4,3 ± 0,2*
	10	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1*
	11	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,1*
	12	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2*
	13	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1*
Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.						
* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.						

En una OGTT realizada en el día 14 del estudio, FP1 disminuye significativamente los niveles de glucosa en comparación con los animales tratados con el vehículo en todos los puntos de tiempo posteriores al tiempo 0 en las tres dosis probadas (Tabla 10). Esta se cuantificó, además, como área total bajo la curva (AUC) y delta AUC, que fueron significativamente inferiores en comparación con el vehículo para las tres dosis probadas (Tabla 10 y Figuras 5A y 5B).

Tabla 10: Niveles de glucosa sanguínea (mg/dl) durante la OGTT

después de catorce días de la dosificación q3d de FP1 en ratones DIO

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del reto con glucosa (min)					AUC total (mg/dL/ 120 min)	Delta AUC (mg/dL/ 120 min)
		0	30	60	90	120		
Vehículo	NA	209,6 ± 16,5	399,4 ± 46,4	338,5 ± 46,3	297,5 ± 38,0	269,3 ± 36,6	38244,4 ± 4308,2	13089,4 ± 3573,0
FP1	0,1	196,6 ± 7,6	319,0 ± 21,5*	241,6 ± 14,4*	196,0 ± 12,8*	184,0 ± 6,3*	28408,1 ± 1236,1*	4885,5 ± 955,1*
	1	164,0 ± 7,2	251,4 ± 13,0*	227,6 ± 12,6*	191,9 ± 9,4*	180,6 ± 13,1*	25295,6 ± 1026,7*	5615,6 ± 647,6*

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del reto con glucosa (min)					AUC total (mg/dL/120 min)	Delta AUC (mg/dL/120 min)
		0	30	60	90	120		
	10	146,6 ± 5,9	195,6 ± 14,5*	197,1 ± 6,9*	172,1 ± 6,3*	174,9 ± 13,8*	21768,8 ± 603,0*	4211,4 ± 425,8*
Rosiglitazona	10 mpk/día	130,8 ± 6,0	199,1 ± 12,9*	204,4 ± 8,5*	184,1 ± 10,9*	169,1 ± 5,7*	22115,6 ± 671,9*	6425,6 ± 599,6

Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

Se midieron los niveles de glucosa en sangre alimentada al inicio

(día 0), en el día 7 y en el día 13 del estudio (Tabla 6 y Figura 11). FP1 la

disminuyó la glucosa en sangre en una forma estadísticamente significativa en dosis de 1 nmol/kg y de 10 nmol/kg en el día 13 del estudio.

Tabla 11: Glucosa en sangre alimentada durante el tratamiento de ratones DIO con tratamiento q3d de FP1

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del comienzo del tratamiento (días)		
		0	7	13
Vehículo	NA	177,6 ± 10,9	173,6 ± 10,6	225,3 ± 23,0
FP1	0,1	174,1 ± 8,5	171,8 ± 16,3	196,4 ± 8,1
	1	167,5 ± 7,8	135,1 ± 11,2	165,3 ± 10,3*
	10	165,3 ± 13,7	145,3 ± 4,9	153,8 ± 7,5*
Rosiglitazona	10 mpk/día	189,6 ± 17,3	122,6 ± 8,1*	154,8 ± 6,5*

Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

Los niveles de insulina en plasma durante la OGTT fueron

significativamente superiores para FP1 que para el grupo correspondiente del vehículo para una dosis de 0,1 nmol/kg en 30 minutos, e inferior en las dosis de 1

y 10 nmol/kg en el mismo punto de tiempo (Tabla 12). La salida de insulina durante la OGTT, como se mide por el AUC total, fue superior que el grupo del vehículo para la dosis de 0,1 nmol/kg de FP1 (Tabla 12), e inferior en las dosis de 1 y 10 nmol/kg. En ambos casos, la significancia estadística se alcanzó solamente en la dosis más baja. En el punto de tiempo de 90 minutos, los ratones tratados con 1 y 10 nmol/kg de FP1 tenían niveles más bajos de insulina; sin embargo, este efecto no alcanzó la significación estadística. HOMA-IR, usada como una medida de la sensibilidad a la insulina, se midió en el día 14 del estudio. En este punto de tiempo, FP1 disminuyó la HOMA-IR, o mejoró la sensibilidad a la insulina, a 10 nmol/kg (Tabla 13 y Figura 7).

Tabla 12: Niveles de insulina en plasma (pg/ml) durante una OGTT después de catorce días de dosificación q3d de FP1 en ratones DIO

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del reto con glucosa (min)			AUC total (pg/ml/90 min)
		0	30	90	
Vehículo	NA	6096,0 ± 774,3	14660,0 ± 3031,2	5034,4 ± 405,1	902151,9 ± 143123,2
FP1	0,1	7861,0 ± 779,5	33825,8 ± 7902,0*	6494,4 ± 797,0	1834808,8 ± 381276,1*
	1	4808,1 ± 795,8	13061,8 ± 2226,3	3443,5 ± 342,5	763218,1 ± 119766,8
	10	3478,3 ± 634,6	7147,0 ± 823,8	2958,0 ± 414,0	462528,8 ± 44653,1
Rosiglitazona	10 mpk/día	2965,6 ± 524,2	2203,1 ± 193,5*	1180,0 ± 57,1	179025,0 ± 9970,7

Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

Tabla 13: HOMA-IR en ayunas en ratones DIO después de catorce días de tratamiento q3d de FP1

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	HOMA-IR
Vehículo	NA	93,5 ± 15,3
FP1	0,1	112,4 ± 14,6
	1	56,7 ± 9,7
	10	37,7 ± 8,2*
Rosiglitazona	10 mpk/día	27,3 ± 4,7*

Los datos se expresan como la media ± SEM.

n = 8 por grupo

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

La magnitud de la pérdida de peso lograda alrededor del día 13, no resultó en cambios medibles en la masa de grasa absoluta o la masa de grasa en por ciento en cualquier dosis (Tabla 14). En la dosis de 10 nmol/kg, se observó una disminución significativa de la masa magra absoluta. Esta disminución no se observó cuando se expresan como masa magra. en por ciento. Se midieron los pesos de los hígados durante la necropsia en el día 15 del estudio (Tabla 15). FP1 disminuyó el peso absoluto del hígado y el peso del hígado como un porcentaje del peso corporal en la dosis de 10 nmol/kg. Una disminución se observó en la dosis de 1 nmol/kg, pero esta no alcanzó significación estadística para ningún parámetro. Se midió la grasa del hígado en una biopsia mediante NMR (Tabla 16). La proteína de fusión FP1 disminuyó el contenido de grasa hepática, expresado como un porcentaje del peso de la biopsia hepática, en las dosis de 1 y 10 nmol/kg. La reducción fue significativa en la dosis más alta.

Tabla 14: Composición corporal después de trece días de tratamiento con FP1 q3d en ratones DIO

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Masa de grasa (g)	Masa magra (g)	Masa de grasa (% de la corporal)	Masa magra (% de la corporal)
Vehículo	NA	11,6 ± 0,5	29,6 ± 0,4	23,4 ± 0,8	59,6 ± 0,9
FP1	0,1	12,2 ± 0,4	29,7 ± 0,4	24,1 ± 0,6	58,5 ± 0,6
	1	12,1 ± 0,3	28,0 ± 0,4	25,1 ± 0,3	58,3 ± 0,6
	10	10,6 ± 0,3	27,7 ± 0,4*	23,1 ± 0,3	60,6 ± 0,6
Rosiglitazona	10 mpk/día	14,9 ± 0,6*	30,0 ± 0,5	27,2 ± 0,4*	55,0 ± 0,6*

Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

Tabla 15: Peso del hígado después de quince días de tratamiento con FP1 q3d en ratones DIO

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Peso del hígado (g)	Peso del hígado (% del corporal)
Vehículo	NA	2,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2
FP1	0,1	2,9 ± 0,2	5,8 ± 0,2
	1	2,2 ± 0,1	4,6 ± 0,2
	10	1,9 ± 0,1*	4,2 ± 0,1*
Rosiglitazona	10 mpk/día	2,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2

Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

Tabla 16: Contenido de grasa del hígado medido después de quince días de tratamiento con FP1 q3d en ratones DIO

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Grasa (%)
Vehículo	NA	27,3 ± 2,1

FP1	0,1	26,0 ± 1,4
	1	22,5 ± 1,4
	10	17,8 ± 1,6*
Rosiglitazona	10 mpk/día	25,9 ± 0,8

Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.

5

Ejemplo 11: Efectos de FP1 en los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal en ratones *ob/ob*

El objetivo de este experimento fue evaluar los efectos de FP1 en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre durante ocho días de tratamiento en ratones *ob/ob* obesos, hiperglicémicos, deficientes en leptina.

10

Los ratones *ob/ob* macho se pesaron y FP1 se administró por vía subcutánea a 2 ml/kg cada tres días (q3d) en el día 0, 3 y 6. Se registraron diariamente los pesos de los alimentos y de los ratones. La glucosa se midió diariamente por medio del uso de un glucómetro. Al final del estudio, los ratones se sacrificaron y se recolectó una muestra de sangre terminal.

15

FP1, en la dosis de 1 nmol/kg, disminuyó significativamente el peso corporal (expresado como un porcentaje del peso corporal de partida) en ratones *ob/ob* a partir del día 2 hasta el día 8, en relación con los ratones tratados con vehículo. FP1, en la dosis de 10 nmol/kg, disminuyó significativamente el peso corporal (expresado como un porcentaje del peso corporal de partida) en ratones *ob/ob* a partir del día 1 hasta el día 8, en relación con los ratones tratados con vehículo (Tabla 17 y Figura 8).

20

Tabla 17: Cambio de peso corporal (% del inicial) durante el tratamiento con FP1 q3d en ratones *ob/ob*

Tratamiento	Vehículo	FP1	
		1 nmol/kg	10 nmol/kg
Día	n/a		
-6	-2,5 ± 0,3	-2,8 ± 0,4	-3,6 ± 0,5
-5	-2,4 ± 0,3	-3,0 ± 0,5	-3,5 ± 0,5
-4	-1,9 ± 0,2	-2,5 ± 0,4	-2,8 ± 0,3
-1	-0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	-0,3 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,5 ± 0,2	-1,6 ± 0,2	-2,3 ± 0,5*
2	1,1 ± 0,2	-1,8 ± 0,4*	-2,0 ± 0,9*
3	1,3 ± 0,3	-2,5 ± 0,4*	-3,1 ± 1,1*
4	1,8 ± 0,3	-3,3 ± 0,5*	-4,2 ± 1,3*
5	1,8 ± 0,4	-3,5 ± 0,5*	-4,7 ± 1,5*
6	2,0 ± 0,5	-4,0 ± 0,7*	-5,7 ± 1,6*
7	2,8 ± 0,6	-4,8 ± 0,8*	-6,3 ± 1,7*
8	3,5 ± 0,8	-4,5 ± 1,0*	-6,1 ± 1,9*
Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.			
* = p<0,05, en comparación con el del grupo tratado con el vehículo.			

FP1, en la dosis de 10 nmol/kg, disminuyó los valores de glucosa en sangre alimentada en ratones *ob/ob* en el día 1 y 2 del estudio y desde el día 4 hasta el día 8 en relación con los ratones tratados con vehículo. Una reducción en el nivel de glucosa en sangre se observó en 1 nmol/kg; sin embargo, este efecto no alcanzó la significación estadística (Tabla 18 y Figura 9).

Tabla 18: Glucosa en sangre alimentada durante el tratamiento de ratones *ob/ob* con FP1 q3d

Tratamiento	Vehículo	FP1	
		1 nmol/kg	10 nmol/kg
Día	n/a		

	-6	463,6 ± 31,2	395,7 ± 52,0	463,6 ± 41,0
	-5	554,9 ± 57,5	609,6 ± 53,6	552,9 ± 53,0
	-4	502,9 ± 41,6	517,9 ± 71,6	490,3 ± 54,4
	-1	552,1 ± 45,1	567,2 ± 51,2	586,0 ± 42,6
	0	468,8 ± 57,3	479,7 ± 61,8	437,0 ± 42,7
5	1	537,0 ± 42,8	439,0 ± 80,4	336,2 ± 51,0*
	2	511,7 ± 43,5	440,0 ± 74,3	293,7 ± 37,6*
	3	447,8 ± 54,2	369,6 ± 75,9	279,4 ± 38,8
	4	516,3 ± 47,0	384,6 ± 84,0	261,2 ± 43,7*
	5	531,0 ± 47,1	410,9 ± 92,2	286,9 ± 55,8*
	6	596,1 ± 45,1	451,1 ± 82,6	301,9 ± 49,3*
	7	566,7 ± 44,3	425,3 ± 86,9	246,7 ± 43,5*
10	8	509,9 ± 37,6	337,8 ± 75,1	223,4 ± 34,1*
Los datos se expresan como Media ± SEM. n=8 por grupo.				

Ejemplo 12: Farmacocinética de multiespecies

Farmacocinética de ratón

FP1 se administró a ratones C57Bl/6 hembra en una dosis de

2 mg/kg IV y SC en PBS, pH 7. Se recogieron muestras de sangre, se procesó el suero y se midieron las concentraciones de fármacos hasta 7 días después de ambas vías de administración. La concentración de FP1 se determinó con el uso de un método de inmunoensayo. La concentración sérica de fármacos-perfil de tiempo se resume en las Tablas 19 y 20 y se ilustra en la Figura 10.

Tabla 19: Concentración sérica (nM) de FP1 con el tiempo después de una sola administración SC en ratones C57Bl/6 hembra

	FP1 - Dosis SC						
Punto de tiempo	Resultado del Animal 56 (nM)	Resultado del Animal 57 (nM)	Resultado del Animal 58 (nM)	Resultado del Animal 60 (nM)	Resultado del Animal 63 (nM)	Resultado promedio (nM)	Desviación estándar
4 h	32,299	50,735	42,766	32,407	23,018	36,245	10,698
24 h	88,822	106,418	88,648	103,841	80,346	93,615	11,093
72 h	33,563	38,473	32,473	33,625	32,769	34,181	2,451
96 h	20,639	24,988	21,247	19,356	20,771	21,400	2,124
Día 7	5,399	6,919	7,234	5,994	5,637	6,237	0,803

Tabla 20: Concentración sérica (nM) de FP1 con el tiempo después de una sola administración IV en ratones C57Bl/6 hembra

	FP1 - Dosis IV						
Punto de tiempo	Resultado del Animal 52 (nM)	Resultado del Animal 53 (nM)	Resultado del Animal 65 (nM)	Resultado del Animal 66 (nM)	Resultado del Animal 70 (nM)	Resultado promedio (nM)	Desviación estándar
1 h	240,419	233,318	232,484	276,913	272,727	251,172	21,857
24 h	86,823	95,774	80,201	93,153	88,853	88,961	6,027
72 h	33,634	37,447	33,108	41,680	34,034	35,981	3,612
96 h	22,666	20,588	19,458	33,718	20,361	23,358	5,909
Día 7	7,401	5,606	4,896	8,556	4,205	6,133	1,803

El análisis farmacocinético reveló una vida media terminal de 1,67 y 1,57 días para FP1 en ratones C57Bl/6 después de la administración SC e IV, respectivamente (Tabla 21). FP1 demostró una biodisponibilidad media de ~71 % después de la administración SC.

Tabla 21: Media ($\pm$ SD) de parámetros farmacocinéticos de FP1 después de la administración IV y SC de 2 mg/kg en ratones C57Bl/6 hembra

Ruta		$t_{1/2}$ (día)	CI o CL/F (ml/día/kg)	Vss (ml/kg)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}^*$ (día)	$AUC_{0-final}$ (día * ng/ml)	AUC_{0-inf} (día * ng/ml)
SC	Media	1,67	49,48		14994	1	38315	40734
	(SD)	(0,14)	(4,791)		(1776)		(3851)	(4072)
IV	Media	1,57	35,00	69,03	40231	0,04	55263	57531
	(SD)	(0,19)	(3,13)	(5,8)	(3500)		(4853)	(5416)

Nota: * $T_{m\acute{a}x}$ (mediana)

Farmacocinética de ratas

FP1 se administró a ratas Sprague Dawley hembra en una dosis de 2 mg/kg IV y SC en PBS, pH 7. Se recogieron muestras de sangre, se procesó el suero y se midieron las concentraciones de fármacos hasta 7 días después de ambas vías de administración. La concentración de FP1 se determinó con el uso de un método de inmunoensayo. La concentración sérica de fármacos-perfil de tiempo se resume en las Tablas 22 y 23 y se ilustra en la Figura 11.

Tabla 22: Concentración sérica (nM) de FP1 con el tiempo después de una sola administración SC en ratas Sprague Dawley hembra

	FP1 - Grupo 3 (dosis SC)						
Punto de tiempo	Resultado del Animal 53 (nM)	Resultado del Animal 55 (nM)	Resultado del Animal 67 (nM)	Resultado del Animal 68 (nM)	Resultado del Animal 69 (nM)	Resultado promedio (nM)	Desviación estándar
4 h	4,766	3,500	3,932	3,546	3,250	3,799	0,593
24 h	45,118	53,192	39,196	39,823	40,804	43,627	5,826
72 h	18,900	24,102	23,124	23,718	18,933	21,755	2,615
96 h	12,193	14,333	14,185	14,669	11,256	13,327	1,511
Día 7	2,805	2,821	2,447	3,438	2,358	2,774	0,426

Tabla 23: Concentración sérica (nM) de FP1 con el tiempo después de una sola administración IV en ratas Sprague Dawley hembra

Punto de tiempo	FP1 - Grupo 4 (dosis IV)						Desviación estándar
	Resultado del Animal 51 (nM)	Resultado del Animal 52 (nM)	Resultado del Animal 57 (nM)	Resultado del Animal 64 (nM)	Resultado del Animal 66 (nM)	Resultado promedio (nM)	
1 h	43,620*	382,676	403,255	443,080	510,105	356,547	181,560
24 h	102,665*	142,661	139,066	124,528	126,425	127,069	15,728
72 h	46,720	60,105	67,090	59,257	70,423	60,719	9,127
96 h	29,409	39,897	41,225	42,258	48,074	40,173	6,779
Día 7	6,976	11,251	8,913	9,540	13,006	9,937	2,298

* Repetir el análisis confirmó los resultados

El análisis farmacocinético reveló una vida media terminal de 1,34 y 1,51 días para FP1 en ratas Sprague Dawley después de la administración SC e IV, respectivamente (Tabla 24). FP1 demostró una biodisponibilidad media de ~23 % después de la administración SC.

Tabla 24: Media ($\pm$ SD) de parámetros farmacocinéticos de FP1 después de la administración IV y SC de 2 mg/kg en ratas Sprague Dawley

Ruta		$t_{1/2}$ (día)	Cl o CL/F (ml/día/kg)	Vss (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (día)	AUC _{0-final} (día * ng/ml)	AUC _{0-inf} (día * ng/ml)
SC	Media	1,34	100,09		6987	1	19250	20112
	(SD)	(0,04)	(3,97)		(417)		(794)	(820)
IV	Media	1,51	24,75	53,41	59000	0,04	83028	86525
	(SD)	(0,12)	(8,53)	(17,15)	(25031)		(20126)	(20881)

Nota: * T_{máx} (mediana)

Farmacocinética de monos

FP1 se administró a monos cynomolgus macho (*Macaca fascicularis*) no tratados previamente en una dosis de 1 mg/kg IV y SC en PBS, pH 7. Se recogieron muestras de sangre, se procesó el suero y se midieron las concentraciones de fármacos hasta 21 días después de ambas vías de administración mediante el uso de bioanálisis de inmunoensayo. La concentración sérica de fármacos-perfil de tiempo se resume en las Tablas 25 y 26 y se ilustra en la Figura 12.

Tabla 25: Concentración sérica (nM) con el tiempo después de una sola Administración SC de FP1 en monos cynomolgus, según se determina por inmunoensayo

	FP1 (Dosis SC)				
Punto de tiempo	Animal 110 (nM)	Animal 111 (nM)	Animal 112 (nM)	Resultado promedio (nM)	Desviación estándar
Predosis	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	n/a
6 h	49,304	43,784	72,110	55,066	15,017
24 h	93,368	71,958	96,863	87,396	13,483
48 h	107,689	97,509	115,144	106,781	8,853
72 h	113,601	104,190	104,449	107,414	5,360
120 h	101,490	95,049	91,717	96,085	4,968
168 h	82,167	75,435	81,569	79,724	3,726
240 h	71,033	56,732	59,266	62,344	7,631
336 h	44,380	42,758	42,571	43,236	0,995
432 h	30,911	29,445	32,839	31,065	1,702
528 h	21,277	20,404	26,427	22,703	3,255

Tabla 26: Concentración sérica (nM) con el tiempo después de una sola Administración IV de FP1 en monos cynomolgus, según se determina por inmunoensayo

	FP1 (Dosis IV)				
Punto de tiempo	Animal 104 (nM)	Animal 105 (nM)	Animal 106 (nM)	Resultado promedio (nM)	Desviación estándar
Predosis	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	n/a
1 h	212,661	235,168	189,000	212,276	23,087
6 h	190,315	185,331	183,575	186,407	3,497
24 h	141,743	155,943	146,487	148,058	7,229
48 h	111,765	126,105	120,744	119,538	7,246
72 h	105,076	106,955	106,441	106,157	0,971
120 h	92,591	103,882	103,757	100,077	6,483
168 h	71,368	93,055	87,706	84,043	11,298
240 h	71,554	65,093	65,685	67,444	3,572
336 h	46,184	38,961	41,696	42,280	3,647
432 h	34,589	31,266	19,492	28,449	7,933
528 h	26,885	24,154	22,422	24,487	2,250

El análisis farmacocinético reveló una vida media terminal de 8,5 y 9,2 días para FP1 en monos cynomolgus después de la administración SC e IV, respectivamente, con una biodisponibilidad media de ~88 % después de la administración SC (Tabla 27).

Tabla 27: Media ($\pm$ SD) de parámetros farmacocinéticos de FP1 después de la administración IV y SC de 1 mg/kg en monos cynomolgus

Ruta		$t_{1/2}$ (día)	Cl o CL/F (ml/día/kg)	Vss (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (día)	AUC _{0-final} (día * ng/ml)	AUC _{0-inf} (día * ng/ml)
SC	Media	8,5	3,9		17776	3	211030	256202

	(SD)	(1,5)	(0,3)		(950)		(11332)	(20192)
IV	Media	9,2	3,4	45,6	34001	0,04	239758	292206
	(SD)	(0,5)	(0,1)	(1,6)	(3698)		(6095)	(11516)

Nota: * Tmáx (mediana)

Se usó el análisis de LCMS con captura por inmunofinidad para
 5 cuantificar la concentración del dímero intacto presente en el suero de monos
 cynomolgus después de la administración IV y SC (Tablas 28 y 29 Figuras 13 y
 14). Las concentraciones determinadas con este método fueron similares a las
 concentraciones determinadas por el inmunoensayo (IA), lo que demuestra que
 FP1 circula como un dímero intacto, con propensión metabólica no detectable en
 10 monos cynomolgus.

Tabla 28: Concentración sérica (ng/ml) de FP1 como un dímero
 intacto en el tiempo después de una sola administración IV en monos cynomolgus,
 según se determina por análisis de LCMS con captura por inmunofinidad.

Día	Datos de MS del Dímero intacto (Muestras combinadas)	Datos de IA (Promedio)
0,00	0	0
0,04	33347	34537
0,25	29686	30328
1,00	28787	24089
2,00	17249	19449
3,00	16827	17272
5,00	16159	16282
7,00	11124	13674
10,00	8746	10973
14,00	5328	6879
18,00	3857	4629
22,00	2252	3984

Tabla 29: Concentración sérica (ng/ml) de FP1 como un dímero intacto en el tiempo después de una sola administración SC en monos cynomolgus, según se determina por análisis de LCMS con captura por inmunofinidad.

	Día	Datos de MS del Dímero intacto (Muestras combinadas)	Datos de IA (Promedio)
5	0,00	0	0
	0,25	9625	8959
	1,00	15799	14219
	2,00	17671	17373
	3,00	19130	17476
	5,00	12284	15633
	7,00	10808	12971
10	10,00	8910	10143
	14,00	5814	7034
	18,00	4074	5054
	22,00	2967	3694

Se midió, además, la concentración de analitos en suero de monos cynomolgus después de la administración IV y SC, mediante análisis de LC-MS/MS con digestión con tripsina, con captura por inmunofinidad (Tablas 30 y 31). Los péptidos trípticos seleccionados, específicamente, ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK), ASL (ASLEDLGWADWVLSPR) y TDT (TDTGVSLQTYDDLLAK), que se localizan dentro de FP1 cerca del extremo N-terminal de la región de HSA, del extremo N-terminal de GDF15 y del extremo C-terminal de GDF15, respectivamente. Los péptidos se controlaron como péptidos sustitutos de FP1. Las concentraciones de todos los péptidos sustitutos fueron similares entre sí y las concentraciones medidas mediante inmunoensayo, lo que

demuestra que la secuencia de GDF15 en FP1 permanece intacto y unida a la secuencia de HSA *in vivo*.

Tabla 30: Concentración sérica (ng/ml) de péptidos sustitutos que representan varias regiones de FP1 con el paso del tiempo después de una sola administración IV en monos cynomolgus, según se determina por análisis de LC-MS/MS con digestión con tripsina, con captura por inmunofinidad.

Punto de tiempo		FP1 promedio (ng/ml)			Desviación estándar			Datos de IA (ng/ml)
Día	Hora	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/a	n/a	n/a	0,0
0,04	1	32400,0	39766,7	33333,3	2623,0	3162,8	2722,7	34536,9
0,25	6	29100,0	27166,7	30600,0	3439,5	1006,6	2095,2	30328,1
1,00	24	24366,7	23300,0	23800,0	4215,8	3996,2	4100,0	24088,7
2,00	48	19433,3	17733,3	18700,0	1457,2	1193,0	854,4	19448,6
3,00	72	18100,0	17200,0	17166,7	360,6	871,8	1001,7	17271,6
5,00	120	15966,7	14033,3	14233,3	1001,7	642,9	1011,6	16282,3
7,00	168	13733,3	11800,0	12100,0	1115,0	600,0	300,0	13673,6
10,00	240	9303,3	8570,0	8570,0	2290,1	1682,2	1685,9	10973,0
14,00	336	5860,0	5890,0	6056,7	415,8	312,2	388,0	6878,9
18,00	432	4143,3	4400,0	4226,7	374,3	52,9	571,2	4628,6
22,00	528	2830,0	3256,7	2753,3	355,4	420,0	319,0	3984,0

Tabla 31: Concentración sérica (ng/ml) de péptidos sustitutos que representan varias regiones de FP1 con el paso del tiempo después de una sola administración SC en monos cynomolgus, según se determina por análisis de LC-MS/MS con digestión con tripsina, con captura por inmunofinidad.

Punto de tiempo		FP1 promedio (ng/ml)			Desviación estándar			Datos de IA (ng/ml)
Día	Hora	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/a	n/a	n/a	0,0
0,25	6	9323,3	7430,0	8123,3	1900,3	2471,6	1954,1	8959,1
1,00	24	15233,3	13390,0	14533,3	2926,3	3222,0	2683,9	14219,2
2,00	48	15366,7	14000,0	14166,7	2579,4	1646,2	2311,6	17373,0
3,00	72	17300,0	16033,3	15333,3	1571,6	1001,7	986,6	17476,0
5,00	120	15333,3	13366,7	13666,7	1222,0	1692,1	1501,1	15632,9
7,00	168	13333,3	11633,3	11700,0	709,5	472,6	781,0	12970,9
10,00	240	8496,7	7376,7	8343,3	1475,5	189,0	1039,1	10143,2
14,00	336	6046,7	6116,7	6253,3	90,2	118,5	110,6	7034,5
18,00	432	4593,3	5250,0	4636,7	802,6	1157,5	621,7	5054,2
22,00	528	3056,7	3490,0	3116,7	424,5	687,7	220,5	3693,7

Ensayo de estabilidad en plasma humano

El objetivo de este estudio fue analizar la estabilidad *ex vivo* de FP1 en plasma humano. El plasma humano fresco, no congelado se generó a partir de sangre heparinizada de dos sujetos (una macho y una hembra) por centrifugación. FP1 se incubó en esta matriz a 37 °C con mezclado suave, durante 0, 4, 24 y 48 horas. La concentración de FP1 se determinó con el uso de un método de inmunoensayo. La diferencia en por ciento promedio a partir de la concentración inicial (0 hora) varió desde -4,1 a -12,9 y no aumentó con el tiempo, lo que demuestra que FP1 es estable en plasma humano durante hasta 48 horas *ex vivo* (Tabla 32 y Figura 15).

Tabla 32: Concentración de FP1 (µg/ml) después de 0, 4, 24 y 48 horas (h) de incubación *ex vivo* en plasma obtenido a partir de dos sujetos humanos (Sub) según se determina por inmunoensayo

Muestra <i>Ex Vivo</i>	Conc. del Sub 1 macho (ug/ml)	T0 % de diferencia	Conc. del Sub 2 hembra (ug/ml)	T0 % de diferencia	Conc. Promedio (ug/ml)	T0 % de diferencia
Plasma - T0h_ FP1	11,503	n/a	12,649	n/a	12,076	n/a
Plasma - T4h_ FP1	10,524	-8,5	10,521	-16,8	10,523	-12,9
Plasma - T24h_ FP1	9,934	-13,6	12,402	-2,0	11,168	-7,5
Plasma - T48h_ FP1	10,582	-8,0	12,575	-0,6	11,578	-4,1

Se usó LCMS con captura por inmunofinidad para cuantificar la concentración del dímero intacto presente después de la incubación en plasma humano. Las concentraciones determinadas por este método fueron estables con el paso del tiempo (0, 4, 24 y 48 horas), lo que demuestra que FP1 permanece como dímero intacto en plasma humano *ex vivo* hasta 48 horas (Tabla 33 y Figura 16).

Tabla 33: Concentración promedio de FP1 ($\mu\text{g/ml}$) y % de la diferencia desde la concentración inicial como un dímero intacto después de 0, 4, 24 y 48 horas (h) de incubación *ex vivo* en plasma obtenido a partir de dos sujetos humanos según se determina por LCMS con captura por inmunofinidad

	Conc.del Dímero (ug/ml)	% de diferencia
0 h	15,8	100,0
4 h	15,8	100,1
24 h	15,9	100,9
48 h	15,2	96,0

Ejemplo 13: Estrategia de IR

Los ensayos de respuesta inmune (IR) se desarrollarán para la detección de anticuerpo anti-fármaco (ADA) en animales y en muestras clínicas. El ensayo de IR identificará muestras positivas para ADA para la comparación del estado de ADA con resultados farmacocinéticos/tóxicocinéticos (PK/TK), lo que permite la evaluación de la exposición de FP1 y la farmacocinética. El ensayo de IR clínica se usará para selección de muestras séricas, confirmar la especificidad de muestras positivas para ADA y determinar el título de ADA para muestras positivas confirmadas. El desarrollo del ensayo de anticuerpos neutralizantes (NAb), seguirá para usar en muestras positivas confirmadas de sujetos positivos para ADA, en la Fase 1 del programa. Adicionalmente, la determinación de la reactividad cruzada de ADA con GDF15 endógeno seguirá para usar en la Fase 2 del programa. La evaluación del riesgo de inmunogenicidad se llevará a cabo antes del primer ensayo clínico en humanos (FIH) y pueden implementarse ensayos de caracterización adicionales de la respuesta inmune si se justifican.

Ejemplo 14: Plan de Toxicología

Dado que el receptor objetivo endógeno para GDF15 no se ha identificado, existe la falta de unión y de datos funcionales *in vitro* para FP1. Sin embargo, los estudios de farmacología y eficacia de una o varias dosis en ratas, ratones y monos cynomolgus han demostrado actividad de FP1 en estas especies, lo que muestra su efecto en la reducción de la ingesta de alimentos, disminución del peso corporal y modulación de la tolerancia oral a la glucosa. La rata y el mono serán, respectivamente, las especies de roedor y no roedor de

pruebas de toxicología sobre la base de resultados de la eficacia, con la comprensión de que la potencia intrínseca de FP1 en el receptor en estas especies (frente a la de seres humanos) no se ha caracterizado completamente.

Los Ejemplos 15-19 implican la caracterización de otra proteína de fusión ilustrativa de la invención, descrita en el Ejemplo 5, que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 92 (codificada por secuencias de nucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 92 (optimización por codón 1) y 110 (optimización por codón 2)). Esta proteína de fusión es una proteína completamente recombinante que existe como un homodímero de una fusión de HSA (C34S) con la variante de delección del GDF15 maduro humano (201 - 308; Sec. con núm. de ident.: 8) a través de un enlazador de 42 aminoácidos que consiste en residuos de glicina y serina, GS-(GGGGS)₈. La única cisteína nativa libre en la posición 34 de HSA se ha mutado a serina. Esta proteína de fusión particular HSA-GDF15 se denominará como “FP2” en los siguientes ejemplos, para simplificar.

Ejemplo 15: Efectos de FP2 sobre la ingesta de alimentos de ratones C57Bl/6

FP2 se evaluó con respecto a su capacidad para reducir la ingesta de alimentos en ratones macho C57Bl/6 después de una sola dosis. Se usaron en el estudio ratones macho C57Bl/6N (10 - 12 semanas de edad) obtenidos de Taconic Biosciences (Hudson, NY). Los ratones se alojaron individualmente en una habitación con temperatura controlada con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (6am/6pm) y acceso *ad libitum* a comida y agua. Los ratones macho C57Bl/6 se aclimataron durante un mínimo de 72 horas en las jaulas BioDAQ. Los ratones

después se agruparon en base a la ingesta de alimentos en las últimas 24 horas en seis grupos de ocho cada uno. Entre 4:00 - 5:00 pm, los animales se pesaron y se dosificaron con vehículo o compuestos a través de inyección subcutánea. Se registró continuamente el cambio en el peso de los alimentos para cada jaula por el sistema BioDAQ, durante un período de 48 horas después de la administración del compuesto. 6xHis - FP1 se usó como un comparador en este estudio.

FP2 tuvo efectos significativos en la reducción de la ingesta de alimentos en 12, 24 y 48 horas después de la administración a todos los niveles de dosis probados (Tabla 34). Hubo una reducción en el cambio porcentual en la ingesta de alimentos con respecto a PBS a todos los puntos de tiempo y todos los niveles de dosis (Tabla 35) en ratones.

Tabla 34: Efecto de una sola dosis de FP2 sobre la ingesta de alimentos en ratones C57Bl/6 durante 48 horas

Ingesta de alimentos acumulativa (g)			
Tratamiento	12 horas	24 horas	48 horas
PBS	3,7±0,2	4,4±0,2	8,8±0,4
FP2, 1 nmol/kg	2,8±0,4*	3,0±0,4**	6,9±0,7*
FP2, 4 nmol/kg	2,4±0,2***	3,1±0,2**	7,0±0,3*
FP2, 8 nmol/kg	1,9±0,2****	2,4±0,1****	6,2±0,2***
FP2, 16 nmol/kg	1,8±0,1****	2,7±0,1***	6,3±0,4**
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	2,3±0,3***	2,8±0,4**	6,6±0,7**

Los datos se expresan como la media ± SEM.

*p≤0,05, en comparación con PBS

**p≤0,01, en comparación con PBS

***p≤0,001, en comparación con PBS

****p≤0,0001, en comparación con PBS, respectivamente

Análisis estadísticos usados: ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

n=8/grupo, excepto para 6xHis-FP1 8 nmol/kg (n=6).

Tabla 35: Efecto de una sola dosis de FP2 sobre el porcentaje de reducción en la ingesta de alimentos (con relación al vehículo) durante 48 horas en ratones C57Bl/6

Porcentaje de inhibición en relación a PBS			
Tratamiento	12 horas	24 horas	48 horas
PBS	0,0±7,9	0,0±7,7	0,0±5,9
FP2, 1 nmol/kg	22,4±12,5*	31,8±10,5**	21,8±8,1*
FP2, 4 nmol/kg	36,6±7,2***	30,4±5,8**	20,2±4,7*
FP2, 8 nmol/kg	47,0±6,2****	45,7±3,8****	29,7±3,9***
FP2, 16 nmol/kg	49,2±4,1****	38,1±4,1***	27,8±5,1**
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	36,9±9,9***	36,5±8,8**	24,6±8,2**

El efecto anoréxico de FP2 se expresa como la reducción relativa en la ingesta de alimentos en comparación con los respectivos controles de PBS.

Los datos se expresan como la media ± SEM.

*p≤0,05, en comparación con PBS

**p≤0,01, en comparación con PBS

***p≤0,001, en comparación con PBS

****p≤0,0001, en comparación con PBS, respectivamente

Análisis estadísticos usados: ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

n=8/grupo, excepto para 6xHis-FP1 8 nmol/kg (n=6).

Ejemplo 16: Efectos de FP2 sobre la ingesta de alimentos en ratas Sprague Dawley

FP2 se evaluó con respecto a su capacidad para reducir la ingesta de alimentos y la ganancia de peso corporal en ratas Sprague-Dawley machos, después de una sola dosis. Los animales se obtuvieron de Charles River Labs (Wilmington,

MA), a 200 - 225 g de peso corporal y se usaron dentro de la semana de la entrega. Ellos se alojaron uno por caja en lecho seco y un tubo plástico para enriquecimiento en una habitación con temperatura controlada con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Tuvieron acceso *ad libitum* al agua y se alimentaron con dieta de roedores de laboratorio; dieta de roedores 20, 5K75* PicoLab® certificada irradiada (distribuida por Purina Mills, St. Louis, MO. via ASAP Quakertown, PA). Los pesos de los animales se tomaron y registraron para cada rata antes de la dosificación.

Los animales se aclimataron durante un mínimo de 72 horas en las jaulas BioDAQ; las ratas después se agruparon en base a la ingesta de alimentos en las últimas 24 horas en seis grupos de ocho cada uno. Entre 4:00 - 5:00 pm, los animales se pesaron y se dosificaron con vehículo o compuestos a través de inyección subcutánea. Se registró continuamente el cambio en el peso de los alimentos para cada jaula por el sistema BioDAQ, durante un período de 48 horas después de la administración del compuesto. 6XHis - FP1 se usó como un comparador en este estudio.

Se probaron las reducciones dependientes de la dosis en la ingesta de alimentos después de una sola dosis de FP2. Ninguna diferencia significativa en la ingesta de alimentos se observó en la dosis de 0,3 nmol/kg. Se observaron efectos significativos en la reducción de la ingesta de alimentos a las 12 horas, pero no a 24 o 48 horas a 1 nmol/kg. Se observaron reducciones significativas en la ingesta de alimentos en todos los puntos de tiempo para niveles de dosis de 3 y 10 nmol/kg (Tabla 36, Figura 19). Hubo una reducción en el cambio porcentual

en la ingesta de alimentos con respecto a PBS a todos los puntos de tiempo y todos los niveles de dosis (Tabla 37).

Tabla 36: Efecto de una sola dosis de FP2 sobre la ingesta de alimentos a lo largo de 48 horas en ratas Sprague Dawley.

5	Ingesta de alimentos acumulativa (g)			
	Tratamiento	12 horas	24 horas	48 horas
	PBS	21,7±0,6	25,0±0,8	53,1±1,6
	FP2, 0,3 nmol/kg	19,5±0,9	22,9±0,7	48,4±1,5
	FP2, 1 nmol/kg	17,5±0,9*	19,8±0,8	47,0±2,6
	FP2, 3 nmol/kg	16,1±1,2**	17,0±1,0**	39,2±3,2**
	FP2, 10 nmol/kg	15,8±0,9***	16,5±0,9**	36,5±3,2**
10	6XHis - FP1 8 nmol/kg	15,0±1,4***	15,7±1,2**	37,2±4,5**

Los datos se expresan como la media ± SEM.

* $p \leq 0,05$, en comparación con PBS

** $p \leq 0,01$, en comparación con PBS

*** $p \leq 0,001$, en comparación con PBS, respectivamente

Análisis estadísticos usados: ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

15

n = 8/grupo

Tabla 37: Efecto de una sola dosis de FP2 sobre el porcentaje de reducción en la ingesta de alimentos (con relación al vehículo) durante 48 horas en ratas Sprague Dawley.

20	Porcentaje de inhibición en relación a PBS			
	Tratamiento	12 horas	24 horas	48 horas
	PBS	0,0±4,0	0,0±4,6	0,0±4,3
	FP2 0,3 nmol/kg	10,0±4,7	8,5±4,1	8,8±3,9
	FP2 1 nmol/kg	19,3±4,7*	20,8±4,1	11,5±5,5
	FP2 3 nmol/kg	25,9±6,1**	32,0±4,7**	26,2±6,5**
	FP2 10 nmol/kg	27,4±4,8***	33,8±4,1**	31,2±6,4**

6XHis - FP1 8 nmol/kg	30,8±6,6***	37,0±5,4**	29,9±8,8**
-----------------------	-------------	------------	------------

El efecto anoréxico de FP2 se expresa como la reducción relativa en la ingesta de alimentos en comparación con los respectivos controles de PBS.

Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM.

* $p \leq 0,05$, en comparación con PBS

5 ** $p \leq 0,01$, en comparación con PBS

*** $p \leq 0,001$, en comparación con PBS, respectivamente

Análisis estadísticos usados: ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

n = 8/grupo

10 **Ejemplo 17: Efectos de FP2 sobre la ingesta de alimentos, peso corporal y la homeostasis de la glucosa en ratones C57Bl/6 obesos inducidos por la dieta (DIO)**

FP2 se evaluó con respecto a su capacidad para reducir la ingesta de alimentos y el peso corporal y mejorar la homeostasis de glucosa en dosificación repetida en ratones macho C57Bl/6 durante un período de 8 días. Se usaron en el estudio ratones macho C57Bl/6 DIO (21 semanas de edad, alimentado con alto contenido de grasas durante 15 semanas) obtenidos de Taconic Biosciences (Hudson, NY). Los ratones se alojaron individualmente en una habitación con temperatura controlada con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (6am/6pm) y acceso *ad libitum* a agua y se alimentaron con dieta de investigación D12492 (Research Diets, New Brunswick, NJ). Los ratones se aclimataron >1 semana en habitación de alojamiento de ratones antes del experimento. Las variables de valoración del estudio se midieron de la ingesta de alimentos, peso corporal, composición corporal y punto final glicémico (OGTT, glucosa en

15

20

sangre). Un día antes de la dosificación, los animales se pesaron y se agruparon por peso corporal (BW). Los ratones se dosificaron por medio de inyección subcutánea. Los animales dosificados con FP2 recibieron este compuesto en el Día 0, Día 3, Día 6, Día 9 y Día 12. El grupo del vehículo y el grupo de rosiglitazona recibieron PBS estéril S.C. en estos días, además. La rosiglitazona se proporcionó en la dieta a 0,015 % p/p *ad libitum*. El BW y la ingesta de alimentos se registró diariamente, durante un período de quince días. La glucosa en sangre se midió en los Días 0, 7 y 13. Una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) se realizó en el Día 14. Los niveles de insulina se midieron en puntos de tiempo seleccionados durante la OGTT. Los ratones se sacrificaron con CO₂ y se recolectaron para su exposición las muestras de sangre terminal por medio de punción cardiaca en el Día 15. Se realizó un estudio Pk separado con tres ratones por grupo de dosis con un total de 15 ratones.

Análisis de exposición-respuesta (E-R) para FP2 en ratones DIO

La mayoría de los animales en grupos de farmacodinámica (PD) (eficacia) tuvo concentraciones de fármacos indetectables en el último día del estudio cuando se obtuvieron las muestras farmacocinéticas (PK), potencialmente debido a la inmunogenicidad. Por lo tanto, la media de los perfiles PK de los grupos PK, en lugar de PK individual de grupos PD, se usaron para conducir la exposición-respuesta (desde el día 3, 6 y 9, respectivamente) para el % de cambio en el peso a partir de los valores iniciales en grupos PD en el correspondiente nivel de dosis. Este método supone que los grupos PK se comporten de manera similar a los grupos PD en términos de la exposición al fármaco.

El modelo $E_{\max}$ (Graphpad Prism 6, log (agonista) frente a la respuesta) se usó para correlacionar la exposición con los datos de respuesta (log transformada de concentraciones de fármacos). La pendiente máxima se fija en 1. Tener en cuenta que los valores de EC_{10} a EC_{50} ajustados al modelo

5 estuvieron dentro del doble entre el día 3, 6 y 9, a pesar de que los estimados de $E_{\max}$ fueron diferentes ($E_{\max} = -4,26 \%$, $-8,18 \%$ y $-9,85 \%$, respectivamente). Algunos animales en el día 9 mostraron, además, la pérdida de exposición al fármaco, debido a la formación potencial de ADA y, por lo tanto, las estimaciones del parámetro E-R basadas en el día 9 deben interpretarse con precaución.

10 Los efectos de dos semanas de exposición de FP2 sobre la ingesta de alimentos, peso corporal, la homeostasis de la glucosa y contenido de grasa en el hígado, se evaluaron en ratones macho C57Bl/6 obesos inducidos por la dieta. La exposición valle entre 1,7 y 3,3 nM de FP2 para el grupo de tratamiento de 0,3 nmol/kg, entre 7,1 y 14 nM para el grupo de tratamiento de 1,0 nmol/kg,

15 entre 20,8 y 41,6 nM para el grupo de tratamiento de 3,0 nmol/kg y entre y 28,5 y 112,9 nM de FP2 para el grupo de tratamiento de 10 nmol/kg, se mantuvo hasta el día 9 en el grupo PK del estudio (n=2 o 3, Tabla 49). Después del día 9, una disminución en los niveles circulantes se observó en la mayoría de los animales, a pesar de la dosificación continuada q3d (Tabla 49). Consistente con esta

20 disminución acelerada, la mayoría de los animales en el grupo PD del estudio tuvo niveles circulantes indetectables de FP2 en el día 15 (Tabla 50).

El tratamiento de ratones DIO con FP2 q3d redujo la ingesta de alimentos (Tabla 38), peso corporal (Tabla 39, 40 y Figura 20) y glucosa en sangre

alimentada en comparación con al tratamiento con vehículo (Tabla 43 y Figura 23).

Una reducción significativa en la ingesta de alimentos se observó en el día 2, día 5 y día 8 para 0,3 nmol/kg, desde el día 1 hasta 7 para 1,0 nmol/día, en el día 1, día 2, día 4 hasta día 6 y día 8 para 3,0 nmol/kg y en el día 1, día 3 hasta día 6, día 8 y día 9 para 10,0 nmol/kg. El porcentaje de los cambios de peso corporal fueron significativos desde el día 5 hasta día 13 para 0,3 nmol/kg, desde el día 3 hasta día 13 para 1,0 nmol/kg y para 10,0 nmol/kg y desde el día 4 hasta día 13 para 3,0 nmol/kg. Los cambios en gramos de peso corporal fueron significativos desde el día 8 para 0,3 nmol/kg, desde el día 6 para 1,0 nmol/kg, desde el día 7 para 3,0 kg/nmol y desde el día 5 para 10,0 nmol/kg. Las disminuciones en los niveles de glucosa en sangre alimentada fueron significativas en el día 7 para los animales en el nivel de dosis de 3,0 nmol/kg y en el día 13 fueron significativas para los animales en el nivel de dosis de 3,0 y 10,0 nmol/kg.

Los ratones DIO tratados con FP2 q3d tuvieron mejor tolerancia a la glucosa en el día 14 en comparación con tratamiento con vehículo durante un reto con glucosa oral (Tabla 41; Figura 21A y 21B). La glucosa fue significativamente menor en 30 minutos para el grupo de 0,3 nmol/kg, en 60 minutos y 120 minutos para grupo de 1,0 nmol/kg, en 120 minutos para el grupo de 3,0 nmol/kg y en 30, 90 y 120 minutos para el grupo de 10,0 nmol/kg. El área total bajo la curva fue significativa para todos los grupos de dosis. Los niveles de insulina durante el reto con glucosa fueron significativamente menores para los grupos de 0,3 y 10,0 nmol/kg en 30 minutos (Tabla 42; Figuras 22A y 22B). Además, en comparación con los animales tratados con vehículo, hubo una reducción significativa en la HOMA-IR en ayunas calculada en

los ratones DIO, después de 14 días de tratamiento con FP2 q3d a 10,0 nmol/kg indicativo de mejor sensibilidad a la insulina (Tabla 44 y Figura 24).

La composición corporal se midió mediante MRI en el día 1 antes del inicio del estudio y en el día 13 (Tabla 47 y Tabla 48). Los ratones DIO tratados con FP2 a 1,0 nmol/kg y 10,0 nmol/kg tuvieron reducciones significativas en la masa de grasa en el día 13; mientras que no hubo cambios en la masa magra para cualquier grupo de tratamiento. En el día 13, el grupo de tratamiento de 10,0 nmol/kg tuvieron un aumento significativo en el porcentaje de masa magra y una reducción significativa en el porcentaje de masa de grasa en comparación con el grupo tratado con el vehículo. Los cambios en el día 1 al día 13 fueron significativos para masa magra en los grupos de tratamiento de 0,3 nmol/kg, 1,0 nmol/kg y 10,0 nmol/kg y fueron significativos para el porcentaje de la masa magra en los grupos de tratamiento de 1,0, 3,0 y 10,0 nmol/kg. Los cambios en el día 1 al día 13 fueron significativos para la masa de grasa y el porcentaje de la masa magra en todos los grupos de tratamiento en comparación con el vehículo.

No hubo ninguna diferencia significativa en los niveles séricos de GDF15 endógeno de ratón entre los animales tratados con vehículo y los ratones tratados con FP2 q3d durante 15 días (Tabla 46).

Conclusión: los resultados sugieren que la mayor exposición a fármacos se asocia, generalmente, con un mayor % de cambio de peso desde los valores iniciales, en un nivel de la población a través de los grupos de dosis estudiados en el día 3, 6 y 9.

La exposición a FP2 más de dos semanas condujo a la reducción en la ingesta de alimentos, la disminución de peso corporal, la disminución de glucosa en sangre, mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en los ratones DIO.

Disminuciones significativas en la ingesta de alimentos durante múltiples días se

5 lograron en 1,0, 3,0 y 10,0 nmol/kg q3d. El peso corporal se redujo significativamente desde tres a cinco días después del inicio del estudio. La glucosa en sangre

alimentada en el día 13 disminuyó significativamente después de la administración de FP2 q3d a 3,0 y 10,0 nmol/kg. La sensibilidad a la insulina representada por una

reducción significativa de HOMA-IR en ayunas se logró 14 días después de

10 10,0 nmol/kg de FP2 administrados q3d. En el día 13, un aumento significativo en el porcentaje de masa magra y una reducción significativa en el porcentaje de masa de grasa se observó en los ratones DIO tratados q3d con 10,0 nmol/kg de FP2.

Tabla 38: Efecto de FP2 en la ingesta de alimentos diaria (g) a lo largo de 13 días de tratamiento.

Tratamiento Día	Vehículo n/a	FP2 (nmol/kg)				Rosiglitazona 10 mpk/día
		0,3	1,0	3,0	10,0	
0	2,0±0,1	1,9±0,1	2,2±0,2	1,9±0,2	1,9±0,2	2,2±0,1
1	2,4±0,2	2,1±0,1	1,6±0,1*	1,5±0,1*	1,3±0,1*	2,7±0,1
2	2,5±0,1	1,8±0,1*	1,7±0,2*	1,9±0,1*	2,0±0,1	3,0±0,2
3	2,5±0,1	2,1±0,1	1,7±0,1*	1,9±0,1	1,8±0,1*	2,8±0,2
4	2,6±0,1	2,0±0,1	1,8±0,1*	1,9±0,1*	1,9±0,1*	2,9±0,2
5	2,8±0,1	2,1±0,2*	2,2±0,1*	2,2±0,0*	1,9±0,1*	2,7±0,2
6	2,8±0,1	2,3±0,2	2,1±0,1*	2,2±0,1*	2,0±0,1*	2,8±0,2
7	2,6±0,2	2,3±0,1	2,0±0,1*	2,0±0,2	2,1±0,1	2,9±0,2
8	2,7±0,2	2,1±0,1*	2,2±0,1	2,0±0,1*	2,0±0,1*	3,1±0,2
9	2,8±0,1	2,3±0,1	2,3±0,2	2,3±0,2^	2,1±0,2*	3,2±0,1
10	2,6±0,1	2,5±0,1	2,4±0,2	2,3±0,2^	2,1±0,2	3,0±0,2

11	2,9±0,1	2,5±0,1	2,8±0,2	2,6±0,4	2,6±0,1	3,3±0,1
12	2,8±0,1	2,7±0,2	2,8±0,1	2,8±0,2	2,9±0,1	3,1±0,2
13	2,7±0,1	2,5±0,2	2,6±0,1	2,6±0,1	2,2±0,1	3,1±0,2

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo, excepto n=7 cuando se indica por ^

* - p<0,05, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos usados: ANOVA RM bidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 39: Efecto de FP2 en el porcentaje de cambio de peso corporal a lo largo de 13 días de tratamiento

Tratamiento Día	Vehículo n/a	FP2 (nmol/kg)				Rosiglitazona 10 mpk/día
		0,3	1,0	3,0	10,0	
-1	-0,1±0,4	0,5±0,2	-0,1±0,1	-0,4±0,2	0,0±0,6	0,1±0,2
0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
1	-0,4±0,5	-1,0±0,3	-2,2±0,4	-1,8±0,6	-2,4±0,5	1,3±0,4
2	-0,4±0,3	-2,2±0,4	-3,4±0,6	-3,0±0,6	-3,1±0,4	1,3±0,5
3	-0,3±0,4	-2,3±0,4	-4,2±0,6*	-3,5±0,6	-4,3±0,5*	1,9±0,5
4	-0,3±0,5	-2,9±0,5	-5,3±0,6*	-4,9±0,7*	-5,8±0,7*	1,8±0,7
5	-0,2±0,4	-4,2±0,7*	-6,2±0,6*	-5,6±0,7*	-6,8±0,7*	1,7±0,8
6	-0,4±0,6	-5,1±0,7*	-7,4±0,8*	-6,9±0,7*	-8,5±0,9*	1,1±0,9
7	0,2±0,8	-5,1±0,7*	-7,7±0,9*	-7,4±0,7*	-8,7±0,9*	2,0±1,0
8	0,2±1,0	-6,1±0,8*	-7,9±0,9*	-8,0±0,8*	-9,7±0,8*	2,4±1,1
9	0,5±1,1	-6,0±0,9*	-8,4±0,9*	-8,8±0,9*	-10,1±1,0*	3,1±1,0
10	1,1±1,2	-5,7±0,8*	-8,1±0,9*	-8,9±0,9*	-10,7±1,2*	3,5±1,2
11	1,2±1,3	-6,1±0,9*	-8,2±0,8*	-8,6±1,3*	-11,1±1,4*	3,7±1,2
12	1,4±1,3	-6,3±1,2*	-7,7±0,8*	-8,2±1,4*	-10,9±1,4*	4,1±1,3
13	1,7±0,9	-5,8±1,4*	-7,1±1,0*	-7,2±1,4*	-10,9±1,4*	4,7±1,3

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* p<0,05, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos usados: ANOVA RM bidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 40: Efecto de FP2 en el cambio de peso corporal (g) a lo largo de 13 días de tratamiento

Tratamiento	Vehículo	FP2 (nmol/kg)				Rosiglitazona
Día	n/a	0,3	1,0	3,0	10,0	10 mpk/día
-1	44,6±0,6	44,5±0,6	44,5±0,6	44,5±0,6	44,5±0,6	44,5±0,6
0	44,6±0,6	44,3±0,6	44,6±0,6	44,7±0,6	44,6±0,7	44,4±0,6
1	44,5±0,7	43,8±0,6	43,6±0,6	43,9±0,7	43,5±0,7	45,0±0,7
2	44,5±0,7	43,3±0,7	43,1±0,6	43,3±0,7	43,2±0,7	45,0±0,7
3	44,5±0,7	43,2±0,7	42,7±0,6	43,1±0,7	42,6±0,6	45,3±0,7
4	44,5±0,7	43,0±0,7	42,2±0,6	42,5±0,7	42,0±0,7	45,2±0,7
5	44,5±0,7	42,4±0,7	41,8±0,5	42,2±0,7	41,5±0,6*	45,2±0,7
6	44,5±0,7	42,0±0,7	41,3±0,6*	41,6±0,7	40,7±0,5*	44,9±0,8
7	44,7±0,7	42,0±0,7	41,1±0,6*	41,4±0,7*	40,6±0,5*	45,3±0,8
8	44,7±0,7	41,6±0,7*	41,1±0,7*	41,1±0,7*	40,2±0,6*	45,5±0,8
9	44,8±0,7	41,6±0,8*	40,8±0,7*	40,8±0,8*	40,0±0,8*	45,8±0,7
10	45,1±0,7	41,8±0,8*	41,0±0,8*	40,8±0,8*	39,8±0,8*	46,0±0,8
11	45,2±0,8	41,6±0,8*	40,9±0,7*	40,8±0,9*	39,6±0,9*	46,1±0,8
12	45,3±0,7	41,5±0,9*	41,2±0,7*	41,0±0,9*	39,7±0,9*	46,3±0,9
13	45,4±0,7	41,7±0,9*	41,4±0,8*	41,5±0,9*	39,7±0,9*	46,5±0,9

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA RM bidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 41: Efecto de FP2 en los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) durante la OGTT después de 14 días de tratamiento

5	Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del reto con glucosa (min)					AUC total (mg/dl/120 min)	Δ AUC (mg/dl/120 min)
			0	30	60	90	120		
	Vehículo	NA	161±10	225±17	228±14	208±18	213±19	25429±1228	6094±1430
10	FP2	0,3	144±4	163±14*	209±11	180±12	171±7	21270±399*	3985±521
		1,0	151±9	179±18	188±7	179±13	163±8*	21096±754*	2972±907
		3,0	149±8	180±18	179±11*	164±6	163±9*	20338±876*	2426±1058
		10,0	134±6	163±7*	190±13	152±7*	163±8*	19599±614*	3539±1198
	Rosiglitazona	10 mpk/día	132±9	152±10*	162±13*	138±9*	159±9*	17904±632*	2139±1179

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

15 * - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA RM bidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey para valores de glucosa;

ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey para AUC

Tabla 42: Efecto de FP2 en los niveles de insulina (ng/ml) durante la OGTT

20 después de 14 días de tratamiento

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del reto con glucosa (min)			AUC total (ng/ml/90 min)
		0	30	90	
Vehículo	NA	4,2±0,7	12,2±2,3	3,6±0,5	716,1±122,0

FP2	0,3	2,9±0,6	5,8±1,8*	2,4±0,4	377,1±97,3
	1,0	2,9±0,4	8,2±2,6	2,6±0,4	491,8±118,2
	3,0	3,0±0,3	8,4±1,5	2,5±0,3	498,6±77,0
	10,0	2,4±0,4	4,3±0,5*	2,1±0,4	295,5±32,0*
Rosiglitazona	10 mpk/día	0,9±0,1	1,8±0,2*	0,8±0,1	118,5±9,6*

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA RM bidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey para valores de insulina;

ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey para AUC

Tabla 43: Efecto de FP2 sobre los niveles de glucosa en sangre alimentada (mg/dl)

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después del comienzo del tratamiento (días)		
		0	7	13
Vehículo	NA	162±5	159±6	180±9
FP2	0,3	143±5	150±9	168±9
	1,0	153±12	135±7	159±7
	3,0	148±3	127±6*	151±8*
	10,0	146±6	136±4	148±3*
Rosiglitazona	10 mpk/día	137±7	117±4*	134±6*

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA RM bidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 44: HOMA-IR en ayunas en ratones DIO después de 14 días de tratamiento q3d con FP2

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	HOMA-IR
Vehículo	NA	48,7±9,2
FP2	0,1	30,1±6,6
	1,0	30,5±3,8
	3,0	31,3±3,2
	10,0	22,7±3,1*
Rosiglitazona	10 mpk/día	8,7±1,0*

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* - $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 45: Peso del hígado después de 15 días de tratamiento con FP2 q3d en ratones DIO

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Peso del hígado, (g)	Peso del hígado (% del corporal)
Vehículo	NA	1,9±0,1	4,3±0,3
FP2	0,1	1,7±0,1	4,0±0,1
	1,0	1,7±0,0	4,2±0,1
	3,0	1,8±0,1	4,2±0,1

	10,0	1,7±0,1	4,2±0,1
Rosiglitazona	10 mpk/día	1,9±0,1	4,1±0,2

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

5 * - p<0,05, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 46: Niveles séricos de GDF15 (pg/ml) de ratón, después de 15 días de tratamiento con FP2 q3d en ratones DIO

10	Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	mGDF15
	Vehículo	NA	258,3±21,4
	FP2	0,1	214,1±10,3
		1,0	191,6±12,7
15		3,0	254,5±28,6
		10,0	202,0±10,0
	Rosiglitazona	10 mpk/día	509,6±26,2*

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

20 * - p<0,05, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 47: Efecto de JNJ-64739090 q3d en ratones DIO sobre la composición corporal (g) medido por MRI

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Grasa (g) día -1	Grasa (g) día 13	Δ Grasa (g)	Masa magra (g) Día -1	Masa magra (g) Día 13	Δ Masa magra (g)
Vehículo	NA	17,4 $\pm$ 0,6	18,2 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,3	25,4 $\pm$ 0,3	25,1 $\pm$ 0,3	-0,4 $\pm$ 0,2
FP2	0,3	17,0 $\pm$ 0,6	15,2 $\pm$ 0,8	-1,9 $\pm$ 0,6*	25,8 $\pm$ 0,7	24,5 $\pm$ 0,5	-1,2 $\pm$ 0,2*
	1,0	17,0 $\pm$ 0,6	14,9 $\pm$ 0,6*	-2,1 $\pm$ 0,4*	25,8 $\pm$ 0,5	24,6 $\pm$ 0,4	-1,2 $\pm$ 0,2*
	3,0	17,4 $\pm$ 0,7	15,1 $\pm$ 1,1	-2,3 $\pm$ 0,5*	25,3 $\pm$ 0,4	24,2 $\pm$ 0,4	-1,1 $\pm$ 0,1
	10,0	16,7 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 0,8*	-3,6 $\pm$ 0,5*	26,1 $\pm$ 0,6	24,5 $\pm$ 0,6	-1,7 $\pm$ 0,2*
Rosiglitazona	10 mpk/Día	17,2 $\pm$ 0,6	19,1 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,6	25,5 $\pm$ 0,7	25,1 $\pm$ 0,6	-0,4 $\pm$ 0,2

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 48: Efecto de FP2 q3d en ratones DIO sobre la composición corporal (%) medido por MRI

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Grasa (%) Día -1	Grasa (%) Día 13	Δ Grasa (%)	Masa magra (%) Día 1	Masa magra (%) Día 13	Δ Masa magra (%)
Vehículo	NA	38,1 $\pm$ 1,0	40,1 $\pm$ 1,0	2,1 $\pm$ 0,3	55,9 $\pm$ 0,9	55,3 $\pm$ 0,9	-0,6 $\pm$ 0,3
FP2	0,3	37,6 $\pm$ 1,2	36,3 $\pm$ 1,3	-1,3 $\pm$ 0,9*	56,8 $\pm$ 1,3	59,0 $\pm$ 1,4	2,2 $\pm$ 0,8
	1,0	37,2 $\pm$ 1,1	35,8 $\pm$ 0,9	-1,4 $\pm$ 0,5*	56,7 $\pm$ 1,1	59,5 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 0,6*
	3,0	38,3 $\pm$ 1,4	36,1 $\pm$ 2,0	-2,3 $\pm$ 0,7*	55,9 $\pm$ 1,2	58,7 $\pm$ 2,0	2,8 $\pm$ 0,8*
	10,0	36,9 $\pm$ 1,1	33,1 $\pm$ 1,5*	-3,8 $\pm$ 0,8*	57,5 $\pm$ 1,0	61,7 $\pm$ 1,4*	4,2 $\pm$ 0,7*
Rosiglitazona	10 mpk/Día	38,0 $\pm$ 1,2	41,1 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,9	56,2 $\pm$ 1,2	53,9 $\pm$ 0,8	-2,3 $\pm$ 0,8

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por tiempo por grupo

* $p < 0,05$, en comparación con el vehículo

Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 49: Exposiciones séricas de FP2 (nM) del grupo PK durante el tratamiento

5 q3d en ratones DIO

		Tiempo posterior a la dosis inicial (Tiempo posterior a la última dosis)						
		Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 14 (48 h)	Día 15 (72 h)	Día 17 (120 h)
10	0,1 nmol/ kg	9	1,930	2,993	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		10	1,853	3,369	2,817	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		11	1,715	2,637	2,568	2,709	3,441	1,313
15	1,0 nmol/ kg	9	8,198	9,660	9,645	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		10	7,073	10,595	8,966	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		11	6,689	13,967	10,802	<LOQ	<LOQ	<LOQ
15	3,0 nmol/ kg	9	20,802	26,329	27,863	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		10	23,563	32,020	41,576	1,168	<LOQ	<LOQ
		11	21,704	30,101	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
20	10,0 nmol/ kg	9	28,495	33,050	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		10	70,779	112,898	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		11	70,404	111,767	55,117	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Los datos se expresan como la concentración para cada animal.

<LOQ=por debajo del límite de la cuantificación; LOQ es 0,494 nM

** Los valores en el día 3, 6, 9 y 12 son inmediatamente antes de la siguiente dosis

Tabla 50: Exposiciones séricas terminales (nM) de FP2 después de 15 días de tratamiento q3d en ratones DIO

Ident. del animal	Grupo de tratamiento (nmol/kg)			
	0,1	1,0	3,0	10,0
1	2,567	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	44,149
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4	1,144	0,678	<LOQ	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
6	3,440	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7	2,727	<LOQ	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Los datos se expresan como la concentración para cada animal.

<LOQ=por debajo del límite de la cuantificación; LOQ es 0,494 nM

Ejemplo 18: Farmacocinética de multiespecies de FP2 y

Respuesta inmune

Farmacocinética de ratón

Las propiedades farmacocinéticas de FP2 se evaluaron cuando se administra por vía subcutánea a ratones hembra C57Bl/6. FP2 se administró por vía subcutánea (n= 5 muestras por punto de tiempo) y por vía intravenosa (n= 5 muestras por punto de tiempo) a ratones hembra C57Bl/6 (Sage Laboratories, St Louis, MO) en un nivel de dosis de 2,0 mg/kg en PBS, (pH 7,3-7,5). La colección de muestra en el último punto de tiempo fue a través de un sangrado terminal. Se recogieron muestras sanguíneas, suero procesado y se midieron las concentraciones de fármacos hasta 168 horas. Los niveles de FP2 se midieron por medio de un método de inmunoensayo. Los perfiles de concentración de fármacos en plasma se resumen en la Tabla 51 y 52 y se ilustra en la Figura 25.

El análisis farmacocinético de FP2 en ratones C57Bl/6 demostró una vida media terminal de ~1,51 y ~1,76 días después de la dosificación IV y SC respectivamente, con una biodisponibilidad media de ~61 % después de la administración SC.

- 5 **Tabla 51:** Concentración sérica (ng/ml) de FP2 después de una sola dosis subcutánea (SC) en ratones C57Bl/6

	FP2 - Dosis SC						
Punto de tiempo	Resultado del Animal 31 (ng/ml)	Resultado del Animal 32 (ng/ml)	Resultado del Animal 33 (ng/ml)	Resultado del Animal 35 (ng/ml)	Resultado del Animal 36 (ng/ml)	Resultado promedio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)
4 h	11310,11	6323,44	23489,21	4357,74	4835,54	10063,21	7995,0
24 h	12378,58	10896,80	17769,03	15928,14	15404,08	14475,33	2785,0
72 h	5127,95	5569,27	6727,37	7909,66	7550,32	6576,91	1210,5
96 h	3059,83	3350,25	4042,04	4095,15	4431,94	3795,84	569,0
168 h	784,61	1202,66	1364,68	1557,60	1678,02	1317,51	348,9

- 15 **Tabla 52:** Concentración sérica (ng/ml) de FP2 después de una sola dosis intravenosa (IV) en ratones C57Bl/6.

Punto de tiempo	FP2 - Dosis IV					Resultado promedio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)
	Resultado del Animal 37 (ng/ml)	Resultado del Animal 40 (ng/ml)	Resultado del Animal 41 (ng/ml)	Resultado del Animal 45 (ng/ml)	Resultado del Animal 48 (ng/ml)		
1 h	49573,59	42382,59	40001,18	43085,75	46443,59	44297,34	3742,9
24 h	22173,85	19120,39	19393,78	19798,29	17459,96	19589,25	1696,7
72 h	8334,33	7989,10	8573,44	9086,37	8186,68	8433,98	422,5
96 h	4478,83	4699,80	4749,93	5331,39	4579,08	4767,81	332,3
168 h	1044,24	1419,64	1393,44	1835,63	979,49	1334,49	343,6

Tabla 53: Parámetros farmacocinéticos de FP2 después de la administración de 2 mg/kg IV y 2 mg/kg SC en ratones C57Bl/6.

Ruta		$t_{1/2}$ (día)	Cl o CL/F (ml/día/kg)	VZ o VZ/F (ml/kg)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}^*$ (día)	$AUC_{0-final}$ (día* ng/ml)	AUC_{0-inf} (día* ng/ml)
SC	Media	1,76	43	108	15619	1	44972	48379
	SD	0,16	8	20	4870		8563	9147
IV	Media	1,51	25	55	44297	0,042	76269	79253
	SD	0,18	1	6	3743		3788	4051

Farmacocinética de ratas

FP2 se administró por vía subcutánea (n= 5 muestras por punto de tiempo) y por vía intravenosa (n= 5 muestras por punto de tiempo) a ratas hembra Sprague-Dawley (Sage Laboratories, St Louis, MO) en un nivel de dosis de 2,0 mg/kg en PBS, (pH 7,3-7,5). La colección de muestra en el último punto de tiempo fue a través de un sangrado terminal. Se recogieron muestras sanguíneas, suero procesado y se midieron las concentraciones de fármacos hasta 168 horas. Los niveles de FP2 se midieron por medio de un método de inmunoensayo. Los perfiles de concentración de fármacos en plasma se resumen en la Tabla 54 y 55 y se ilustra en la Figura 26. Parámetros farmacocinéticos calculados a partir de estos datos se resumen en la Tabla 56.

El análisis farmacocinético de FP2 en ratas Sprague Dawley demostró una vida media terminal de ~1,46 y ~1,37 días después de la dosificación IV y SC respectivamente, con una biodisponibilidad media de ~28 % después de la administración SC.

Tabla 54: Concentración sérica (ng/ml) de FP2 después de una sola dosis subcutánea (SC) en ratas Sprague Dawley.

5		FP2 - Dosis SC						
	Punto de tiempo	Resultado del Animal 01 (ng/ml)	Resultado del Animal 02 (ng/ml)	Resultado del Animal 03 (ng/ml)	Resultado del Animal 04 (ng/ml)	Resultado del Animal 05 (ng/ml)	Resultado promedio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)
	4 h	730,95	257,94	469,95	496,34	400,65	471,16	172,2
	24 h	9236,27	6658,79	7728,92	7449,56	6502,60	7515,23	1092,1
	72 h	4559,04	4464,72	5619,82	4287,25	3844,15	4555,00	655,6
	96 h	2791,97	2452,35	3387,55	2316,06	2176,00	2624,79	483,8
	168 h	622,32	606,36	< 80,00	514,19	476,49	554,84	70,7

Tabla 55: Concentración sérica (ng/ml) de FP2 después de una sola dosis intravenosa (IV) en ratas Sprague Dawley.

		FP2 - Dosis IV						
	Punto de tiempo	Resultado del Animal 06 (ng/ml)	Resultado del Animal 07 (ng/ml)	Resultado del Animal 08 (ng/ml)	Resultado del Animal 09 (ng/ml)	Resultado del Animal 10 (ng/ml)	Resultado promedio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)
15	1 h	60785,80	47392,80	43046,54	46014,25	44547,65	48357,41	7134,5
	24 h	25470,36	24729,88	21157,29	20497,32	21459,71	22662,91	2267,1
	72 h	8208,46	9262,13	8866,76	8635,93	8843,83	8763,42	384,1
	96 h	4433,18	4833,22	4995,63	4630,60	4604,13	4699,35	218,1
	168 h	1083,14	1469,35	1614,61	1394,17	1053,89	1323,03	245,7

Tabla 56: Parámetros farmacocinéticos de FP2 después de la administración de 2 mg/kg IV y 2 mg/kg SC en ratas Sprague-Dawley.

Ruta		$t_{1/2}$ (día)	Cl o CL/F (ml/día/kg)	VZ o VZ/F (ml/kg)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}^*$ (día)	AUC _{0-final} (día* ng/ml)	AUC _{0-inf} (día* ng/ml)
SC	Media	1,37	84	165	7515	1	22614	24036

	SD	0,04	10	17	1092		2509	2893
IV	Media	1,46	23	49	48357	0,042	83271	86089
	SD	0,12	2	6	7135		6081	5820

Farmacocinética de monos

5 FP2 se administró por vía subcutánea a 1 mg/kg y por vía intravenosa a 1 mg/kg a tres monos cynomolgus macho cada una en PBS, (pH 7,0-7,6). Se recogieron muestras sanguíneas, plasma procesado y se midieron las concentraciones de fármacos hasta 21 días.

10 La Farmacocinética (PK) de FP2 se caracterizó después de la administración de una sola dosis IV (1,0 mg/kg) y SC (1,0 mg/kg) en monos cynomolgus. La concentración plasmática del fármaco - perfil de tiempo después de la administración SC se resume en las Tablas 57 y 58 para análisis de inmunoensayo y LCMS respectivamente y después de la administración IV de análisis en las Tablas 59 y 60 para análisis de inmunoensayo y LCMS,

15 respectivamente. Los datos de inmunoensayo se grafica en la Figura 27 y los datos de LCMS se representan en la Figura 28.

 Con el uso de los resultados del análisis de inmunoensayo, la vida media terminal basada en NCA media ($t_{1/2}$) para FP2 fue ~7,05 y ~8,51 días después de la dosificación IV y SC, respectivamente. Los parámetros PK medios

20 después de la administración IV y SC se resumen en la Tabla 61. Con el uso de los resultados del bioanálisis de inmunoensayo, la vida media terminal estimada media por el modelo no compartimental ($t_{1/2}$) para FP2 fue ~7,05 y ~8,51 días después de la dosificación IV y SC, respectivamente. La biodisponibilidad media (%F) de FP2 se

estimó que sea ~98,5 % basada en el AUC_{0-final} y se estimó que sea ~109,2 % basada en AUC_{0-inf} en monos cynomolgus después de la administración SC.

Tabla 57: Concentración plasmática (ng/ml) de FP2 medida por inmunoensayo después de una sola dosis SC en monos cynomolgus.

Tiempo (h)	Inmunoensayo			SC Prom	Desviación estándar
	Animal 704	Animal 705	Animal 706		
0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	n/a
6	7365,3	6128,5	6056,9	6516,9	735,6
24	19716,8	10903,8	10554,7	13725,1	5191,9
48	18191,7	14353,7	14464,7	15670,0	2184,5
72	17813,9	14207,5	12684,0	14901,8	2634,5
120	13823,9	11445,8	10590,8	11953,5	1675,3
168	12359,6	10103,8	9467,8	10643,8	1519,7
240	9457,9	7642,6	8109,1	8403,2	942,7
336	6796,8	5679,8	5235,7	5904,1	804,3
432	5581,3	3830,6	3746,5	4386,1	1035,9
528	4126,2	2613,4	2879,3	3206,3	807,7

N/A=no aplicable

Tabla 58: Concentración plasmática (ng/ml) de FP2 medida por LCMS después de una sola dosis SC en monos cynomolgus.

Tiempo (h)	LC/MS			SC Prom	EEM
	Animal 704	Animal 705	Animal 706		
0	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	n/a
6	6110,0	5910	6200,0	6073,3	85,7
24	Núm.	10420,0	11300,0	10860,0	359,3
48	16560,0	13510,0	14960,0	15010,0	880,8
72	13690,0	13450,0	13380,0	13506,7	93,9
120	11040,0	Núm.	Núm.	11040,0	n/a

168	Núm.	8680,0	9400,0	9040,0	293,9
240	6940,0	7070,0	7140,0	7050,0	58,6
336	4400,0	4580,0	4430,0	4470,0	55,7
432	-	2910,0	-	2910,0	n/a
528	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	n/a

--ejecución inicial ha fallado, no suficiente muestra para repetir el análisis

5 #=tubo equivocado, muestra excluida del análisis

N/A=no aplicable

Tabla 59: Concentración plasmática (ng/ml) de FP2 medida por inmunoensayo después de una sola dosis IV en monos cynomolgus.

Tiempo (h)	Inmunoensayo			IV Prom	Desviación estándar
	Animal 701	Animal 702	Animal 703		
0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	n/a
1	29938,3	31139,0	23545,3	28207,6	4082,0
6	24711,9	21173,0	20434,4	22106,4	2286,5
24	19648,4	21420,9	8662,7	16577,3	6911,3
48	17790,1	17107,0	12983,1	15960,0	2600,7
72	17889,4	13871,1	13692,4	15151,0	2373,3
120	15298,6	11982,5	11361,5	12880,9	2116,7
168	11752,0	10982,8	9933,8	10889,5	912,7
240	8921,1	7465,0	6733,4	7706,5	1113,6
336	6572,8	5750,5	4687,6	5670,3	945,1
432	1099,6	3425,0	3458,0	2660,9	1352,2
528	< 80,0	2069,0	2416,2	2242,6	n/a

20 N/A=no aplicable

Tabla 60: Concentración plasmática (ng/ml) de FP2 medida por LCMS después de una sola dosis IV en monos cynomolgus

	Tiempo (h)	LC/MS			IV Prom	EEM
		Animal 701	Animal 702	Animal 703		
5	0	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	n/a
	1	25340,0	28820	26220,0	26793,3	1044,7
	6	24610,0	26340,0	23810,0	24920,0	746,6
	24	18410,0	18680,0	9810,0	15633,3	2912,7
	48	16290,0	17370,0	13840,0	15833,3	1044,3
10	72	15430,0	14920,0	14280,0	14876,7	332,7
	120	11180,0	11480,0	11440,0	11366,7	94,0
	168	9170,0	Núm.	Núm.	9170,0	n/a
	240	6800,0	7380,0	7600,0	7260,0	238,6
	336	2870,0	3860,0	3480,0	3403,3	288,3
10	432	-	-	3030,0	3030,0	n/a
	528	1150,0	1680,0	1400,0	1410,0	153,1

-=ejecución inicial ha fallado, no suficiente muestra para repetir el análisis

N/A=no aplicable

#=tubo equivocado, muestra excluida del análisis

Tabla 61: Media ($\pm$ SD) de parámetros farmacocinéticos de FP2 después de la administración IV y SC de 1 mg/kg en monos cynomolgus.

Ruta		$t_{1/2}$ (día)	Cl o CL/F (ml/día/kg)	VZ o VZ/F (ml/kg)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}^*$ (día)	$AUC_{0-final}$ (día * ng/ml)	AUC_{0-inf} (día * ng/ml)
SC	Media	8,51	4,6	56	16178	1,67	180792	221032
	SD	1,28	0,8	7	3065		29990	44931
IV	Media	7,05	4,9	51	28208	0,042	183468	202380
	SD	1,45	0,2	12	4082		18268	9617

Los parámetros PK son valores medios en base al NCA de los datos PK de inmunoensayo.

$T_{m\acute{a}x}^*$ (mediana)

Ensayo de estabilidad en plasma humano

La estabilidad *ex vivo* de FP2 se examinó en plasma fresco heparinizado a 37 °C durante hasta 48 horas. El plasma humano fresco, no congelado se generó a partir de sangre heparinizada de dos sujetos (una macho y una hembra) por centrifugación. FP2 se incubó en esta matriz a 37 °C con mezclado suave, durante 0, 4, 24 y 48 horas. La concentración de FP2 se determinó con el uso de un método de inmunoensayo. Se usó la captura independiente por inmunoadfinidad seguido por el método de LCMS para cuantificar la concentración del dímero intacto presente en esta matriz en las condiciones del ensayo.

En el método de inmunoensayo, el porcentaje de recuperación de la concentración inicial varió de 104,8 a 94,1 y no disminuyó con el tiempo, lo que demuestra que FP2 es estable en plasma humano hasta 48 horas *ex vivo* (Figura 29 y Tabla 62). El método LCMS mostró que las concentraciones eran estables con el paso del tiempo lo que demuestra que JNJ-64739090 permanece como un dímero intacto en plasma humano hasta 48 horas *ex vivo* (Figura 30 y Tabla 63).

Tabla 62: Estabilidad *ex vivo* de FP2 (recuperación porcentual normalizada) durante 48 horas en plasma humano (ng/ml) medido por inmunoensayo.

Compuesto	Género	Tiempo (h)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación normalizada
FP2	Hembras	0	9104	100,0
		4	9056	99,5
		24	9332	102,5
		48	9374	103,0
	Machos	0	9473	100,0
		4	9929	104,8
		24	9081	95,9

		48	8912	94,1
--	--	----	------	------

Tabla 63: Estabilidad ex vivo de FP2 (recuperación porcentual normalizada) durante 48 horas en plasma humano (ng/ml) medido por LC/MS intacta.

5	Compuesto	Género	Tiempo (h)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación normalizada
	FP2	Hembras	0	11090	100,0
			4	10830	97,7
			24	10500	94,7
			48	10030	90,4
10		Machos	0	10760	100,0
			4	9640	89,6
			24	10190	94,7
			48	8500	79,0

Ejemplo 19: Eficacia de FP1 y FP2 en monos cynomolgus

Se evaluaron los efectos de FP1 y FP2 en la ingesta de alimentos y del peso corporal después de una sola dosis en monos cynomolgus sin tratamiento previo.

FP1 se administró por vía subcutánea a una cohorte de monos cynomolgus sin tratamiento previo en tres niveles de dosis; 1, 3 y 10 nmol/kg. Se incluyó, además, un grupo tratado con vehículo. Los animales se trataron de manera ciega. El estudio duró un total de 6 semanas: 2 semanas de medición de los valores iniciales de la ingesta de alimentos y recolección de datos, 4 semanas para recolectar datos después de una sola administración del compuesto. Las exposiciones plasmáticas de fármacos se midieron en los días 1, 7, 14, 21 y 28 después de la dosificación.

El tratamiento de monos *Cynomolgus* con una sola dosis de FP1 redujo la ingesta de alimentos y el peso corporal en comparación con el tratamiento con vehículo (Figuras 32-33). Una reducción significativa en la ingesta de alimentos diaria se observó en los días 4, 5, 6 y 8 hasta el 12 para el nivel de dosis de 10 nmol/kg (Figura 32). El promedio semanal de ingesta de alimentos diaria se redujo significativamente durante la semana 2 después de la administración del nivel de dosis de 10 nmol/kg. El nivel de dosis de 3 nmol/kg tuvo significativa reducción en porcentaje del promedio semanal de la ingesta de alimentos antes de la dosificación en la semana 2 después de la administración y el nivel de dosis de 10 nmol/kg tuvo significativa reducción en porcentaje del promedio semanal de la ingesta de alimentos antes de dosificarla en las semanas 1 y 2 después de la administración. Una reducción significativa en el porcentaje de cambio de peso corporal desde el día 0 se observó en el día 28 para el nivel de dosis de 3 nmol/kg y en el día 14, 21 y 28 para el nivel de dosis de 10 nmol/kg (Figura 33).

FP2 se administró por vía subcutánea a una cohorte de monos *cynomolgus* sin tratamiento previo en tres niveles de dosis; 1, 3 y 10 nmol/kg. Se incluyó, además, un grupo tratado con vehículo. Los animales se trataron de manera ciega. El estudio duró un total de 11 semanas: 5 semanas de medición de los valores iniciales de la ingesta de alimentos y recolección de datos, 1 semana de tratamiento y 5 semanas de recolección de datos de la fase de lavado. Las exposiciones plasmáticas de fármacos se midieron en los días 1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la dosificación.

El tratamiento de monos *Cynomolgus* con una sola dosis de FP2 redujo la ingesta de alimentos y el peso corporal en comparación con el tratamiento con vehículo (Figuras 34-35). Una reducción significativa en la ingesta de alimentos diaria se observó en los días 3, 5 hasta el 8, 10 y 12 para el nivel de dosis de 3 nmol/kg y desde los días 3 y hasta el 38 y el día 40 para el nivel de dosis de 10 nmol/kg (Figura 34). El promedio semanal de ingesta de alimentos diaria se redujo significativamente durante la semana 1 posterior a la administración del nivel de dosis de 3 nmol/kg y se redujo significativamente durante las semanas 1 hasta la 6 para el nivel de dosis de 10 nmol/kg. El nivel de dosis de 3 nmol/kg, tuvo significativa reducción en porcentaje desde la semana antes de la dosificación, en el promedio semanal de ingesta de alimentos diaria en la semana 2 después de la administración y el nivel de dosis de 10 nmol/kg, tuvo significativa reducción en porcentaje desde la semana antes de la dosificación, en el promedio semanal de ingesta de alimentos diaria en las semanas 1 hasta la 6 después de la administración. Una reducción significativa en el porcentaje de cambio de peso corporal desde el día 0 se observó desde los días 21 hasta el 42 para el nivel de dosis de 1 nmol/kg, desde los días 14 hasta el 42 para el nivel de dosis de 3 nmol/kg y desde los días 7 hasta el 42 para el nivel de dosis de 10 nmol/kg (Figura 34).

Ejemplo 20: Heterodímero HSA-GDF15:GDF15

Se investigó la bioactividad del heterodímero HSA-GDF15:GDF15.

Para generar un heterodímero HSA-GDF15:GDF15 se diseñaron dos constructos. El primer constructo contenía HSA fusionada al extremo N-terminal de GDF15 maduro (AA 203-308) por medio de un enlazador de glicina-

serina (sec. con núm. de ident.: 93). El segundo constructo contenía una HSA con etiqueta de 6xHistidinas fusionada al extremo N-terminal de GDF15 maduro (AA 197-308) por medio de un enlazador de glicina-serina y un sitio de escisión HRV3C de proteasas (sec. con núm. de ident.: 94). Los plásmidos se

5 transfectaron en forma conjunta en una relación 1:1 mediante el uso del sistema de expresión Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los péptidos se secretaron como proteínas HSA-GDF15, que incluyen tanto las formas de homodímero como heterodímero, en donde los monómeros se unen por los enlaces disulfuro.

10 Los sobrenadantes celulares de células Expi293™ transfectadas temporalmente se cultivaron 5 días después de la transfección, se clarificaron por centrifugación y se filtraron en condiciones estériles (membrana PES de 0,2 µ, Corning). Los sobrenadantes clarificados se cargaron sobre una columna Histrap HP (GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio 20 mM, 500 mM de NaCl,

15 pH 7,4. Después de cargar, las proteínas no unidas se eliminaron por lavado de la columna con un amortiguador de equilibrio. Las proteínas HSA-GDF15, que incluyen tanto las formas de homodímero como heterodímero, se unieron a la columna y se eluyeron con 20 mM de fosfato de sodio, 150 mM de imidazol, pH 7,4. Las fracciones eluidas se combinaron y se incubaron durante la noche a 4 °C

20 en presencia de la enzima HRV3C con etiqueta de 6xHistidinas (Janssen) para generar el heterodímero HSA-GDF15:GDF15. Después de la incubación, la solución proteica se dializó en amortiguador de equilibrio para eliminar el imidazol antes de aplicarla a una columna de HisTrap HP una vez más. El heterodímero

HSA-GDF15: GDF15 eluyó en la etapa de lavado con 20 mM de fosfato de sodio, 50 mM de imidazol, pH 7,4, aunque se retuvieron las proteínas con etiqueta de histidina. El heterodímero se refinó aún más por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con el uso de columna HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) equilibrada en DPBS 1x, pH 7,2. Las fracciones eluidas de la SEC con alta pureza (determinada por SDS-PAGE) del heterodímero HSA-GDF15: GDF15 se combinaron y se filtraron. La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro SynergyHTTM Biotek. La calidad de las proteínas purificadas se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño (Sistema HPLC Ultimate3000). Los niveles de endotoxina se midieron con el uso de un ensayo LAL (Pyrotell®-T, Associates de Cape Cod). La proteína purificada se almacenó a 4 °C.

Las células SK-N-As (ATCC) que expresaron de manera estable el receptor de GDF15 (GFRAL) se sembraron en medio de crecimiento (10 % FBS) en una placa de 96 pocillos 24 horas antes del ensayo. Después de 24 horas las células se privaron de alimento al reemplazar el medio de cultivo con 200 µl de medio DMEM complementado con suero de caballo HI al 1 % durante 3 horas en una incubadora a 37 °C. Después, el medio complementado con suero de caballo HI al 1 % se reemplazó con 200 µl de AB1 y se incubó durante 2 horas adicionales en una incubadora a 37 °C. Para realizar el ensayo, se aspiró el AB1 de todos los pocillos y se adicionó 100 µl de concentraciones variables del compuesto de prueba en AB2 y la placa se incubó durante 15 min en una incubadora a 37 °C. Después de 15 minutos, se eliminó la solución de prueba y

se adicionó 30 µl de amortiguador de lisis (proporcionado en el estuche de detección) y la placa se agitó en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 30 min. Para la detección, se transfirió a una placa de ensayo de 384 pocillos 16 µl de la muestra lisada y se añadieron 4 µl de los anticuerpos de detección HTRF pAKT. La placa se incubó durante la noche a temperatura ambiente y, después, la señal HTRF se leyó en el Envision (Perkin Elmer).

Se calcularon los valores de EC_{50} con el uso de regresión no lineal Graphpad Prism® (curva ajustada). Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar (SE) de tres experimentos por separado con tres réplicas por punto de datos.

La identidad molecular del heterodímero HSA-GDF15: GDF15 se confirmó por espectrometría de masas. El desplazamiento hacia la izquierda de la curva del heterodímero sugiere que el heterodímero HSA-GDF15: GDF15 es más potente para inducir pAKT que la molécula de homodímero pertinente con una albúmina adicional.

Ejemplo 21: Estabilidad térmica del Enlazador

La estabilidad térmica se investigó para diversos enlazadores que conectan GDF15 y HSA. Para evaluar el potencial para fragmentar y agregar, las proteínas de fusión HSA-GDF15 con varios enlazadores se diluyeron hasta 10 mg/ml. Después de la adición de EDTA y metionina, las muestras se incubaron a 40 °C durante 14 días. Después las muestras se diluyeron hasta la concentración de 1 mg/ml y se evaluaron bajo cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC). El por ciento de proteína intacta, así como además la agregación y fragmentación se cuantificaron para estas proteínas. La Tabla 64

muestra que las proteínas HSA-GDF15 con enlazadores que consisten en repeticiones AP son más estables a fragmentarse bajo estrés térmico.

Para evaluar si estos enlazadores afectan la interacción de GDF15 con su receptor, se realizó un inmunoensayo con GFRAL-Fc proteína de fusión recubierta sobre la placa y detección de anti-GDF15 o anti-HSA, con el uso de anticuerpos monoclonales para GDF15 (Janssen) y HSA (Kerafast, Inc., Boston, MA). El ensayo demostró que todas estas variantes de enlazadores en la Tabla 66 tienen unión similar al receptor.

Tabla 64. Resultados de SE-HPLC después del estrés térmico durante 14 días.

Sec. con núm. de ident.	Enlazador	Agregado (%)	Intacta (%)	Fragmento (%)
113	GS-(GGGGS) ₈	3,33	84,44	12,22
115	GA(GGGGA) ₈	3,51	87,98	8,5
117	(AP) ₁₀	1,64	98,36	0
119	(AP) ₁₂	2,36	97,64	0
121	GGs-(EGKSSGSGSESKST) ₃ -GGs	1,67	85,24	13,09
123	GS(PGGGS) ₈	2,96	88,12	8,91
125	GS(AGGGS) ₈	3,44	86,22	10,34
127	GGs-(EGKSSGSGSESKST) ₂ -GGs	1,71	91,17	7,12

Aunque la invención se ha descrito en detalle y con referencia a modalidades específicas de esta, será evidente para los expertos de la materia que pueden hacerse varios cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Las secuencias mencionadas en esta solicitud se proporcionan en la siguiente Tabla:

WT – tipo silvestre

Sec. con número de ident.	Descripción	Secuencia
5	1	Albúmina Sérica Humana, tipo silvestre (HSA)
10	2	Variante de HSA, C34S
15	3	Variante de HSA, C34A
20		

5	HSA (C34S)-GS(GGGGS) ₄ -GDF15 (Tipo silvestre) Fusión	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQH KDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGM FLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKV GSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGKKLV AASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
6	GDF15 Maduro (197-308)	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP ASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
7	GDF15 maduro truncado (200-308)	GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASY NPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
8	GDF15 maduro truncado (201-308)	DHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTM CIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYN PMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
9	GDF15 maduro truncado (202-308)	HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNP MVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
10	GDF15 maduro truncado (203-308)	CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIG ACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM VLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
11	GDF15 maduro truncado (211-308)	CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TG VSLQTYDDLLAKDCHCI

5	25	HSA (C34S)- AS(GGGGS) ₂ GT - - Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLASGGGGSGGGGS GTARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	26	HSA(C34S)- AS(GGGGS) ₈ GT – GDF15 (tipo silvestre)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLASGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGTARNGDH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQ KTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20	27	HSA (C34S)- AS(AP) ₅ GT- Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLASAPAPAPAPG TARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQ VTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASY NPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

5	28	HSA (C34S) AS(AP) ₁₀ GT - Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLASAPAPAPAPAPAP APAPAPAPGTARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	29	HSA (C34S) – AS(AP) ₂₀ GT- Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP PGTARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSR EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20	30	HSA (C34S) – AS(EAAAK) ₄ GT - Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLASEAAAKEAAKEA AAKEAAAKGTARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

5	31	HSA (C34S)- AS(EAAAK) ₈ GT- Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLASEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKG TARNGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	36	HSA (C34S)- GS(GGGGS) ₄ - Fusión GDF15 (mutante 13 por delección)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGCSR LHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
15	37	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - Fusión GDF15 (mutante 14 por delección)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGCSR LHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20			

5	40	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	48	HSA(C34A)- GS(GGGGS) ₄ - Fusión GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
15	55	HSA(C34A)- GS(GGGGS) ₈ - GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKLV VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTE CCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA PCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20			

5	56	HSA(C34A)- (AP) ₁₀ - GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRH PDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPA PAPAPAPAPAPAPARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK PDTVPA PCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	59	HSA(C34S)- (AP) ₁₀ - GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNC ELFQ LGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF TFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAP APAPAPARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA PCC VPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
15	60	HSA (C34S)- GS-(GGGS) ₈ - GDF15 (tipo silvestre)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRH PDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA RNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA PCCVPASY NPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20			

5	64	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (I89R)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD VPAPCCVPASYNPMVLRQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	65	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (I89W)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD VPAPCCVPASYNPMVLWQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
15	66	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (L34A, S35A, R37A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTkVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD VPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20			

5

67	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (V87A, I89A, L98A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECC HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMAL AQKTDGTGVSAQTYDDLLAKDCHCI
----	---	--

10

68	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (L34A, S35A, I89A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECC HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVAAPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL AQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
----	---	--

15

69	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (V87A, I89A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECC HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMAL AQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
----	---	--

20

5	70	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (Q60W)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAWIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV LIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	71	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (W32A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADAVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
15	72	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGAADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20			

5

73	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (Q60A, S64A, R67A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECC HGDILLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAAIKTALHALKPDTVPAAPCCVPASYNPMVL IQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI
74	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A, Q60A, I61A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECC HGDILLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGAADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAAAKTSLHRLKPDTVPAAPCCVPASYNPMV LIKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI
75	HSA (C34S) – GS(GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A, W32A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCCHGDILLEC ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD YSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFEEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSG GGGGSGGGGSGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA DAVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI

10

15

20

76 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:5	gacgcccacaagagcgaggtggcccaccggttcaaggacctgggcgaggagaac tcaaggccctggtgctgatcgccctcgccagtagctgcagcagtcaccttcgagga ccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgctggtggccgacg agagcgccgagaactcgacaagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtg caccgtggccaccctcggggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaag caggagcccagcggaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaaccccaac ctgccccggtggtgctggcccgaggtggacgtgatgtgcaccgcttcacgacaac gaggagaccttctgaagaagtacctgtacgagatcgccggcgggcaccctacttc tacgccccgagctgctgttcttcgccaagcgggtacaaggccgcttcaccgagtgct gccaggccgcgacaaggccgctgctgctgcccagctggacgagctgcggga cgagggaaggccagcagcgaagcagcggctgaagtgcgcagacctgcaga agttcggcgagcgggcttcaaggcctgggcccgtggccggctgagccagcgggtc ccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaagggtgc acaccgagtgctgccacggcgacctgctggagtgcgccgacgaccgggcccacct ggccaagtacatctcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtg ctgcgagaagccctgctggagaagagccactgcacgaggtggagaacgac gagatgcccgccgacctgccagcctggccgaccttcgtggagagcaaggacg tgtgaagaactacgcccagggccaaggacgtgttcctgggcatgttctgtacgagta cgccggcgccgaccccgactacagcgtggtgctgctgctgcccgtggccaagacct acgagaccacctggagaagtgtgcgcccgcgaccccccacgagtgctacgc caaggtgttcgacgagttcaagcccctggtggaggagccccagaacctgatcaagc agaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtagcaagttccagaacgcccgtgtg gtgcggtacaccaagaaggtgcccaggtagcacccccacctggtggaggtga gccggaacctgggcaaggtggcagcaagtgtgcaagcaccgagggccaagc ggatgccctgcgcccaggactacctgagcgtggtgctgaaccagctgtgcgtgctgc acgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctggt gaaccggcgcccctgctcagcgcctggaggtggacgagacctacgtgcccaag gagttcaacgcccagaccttcacctccacgcccagacatctgcacctgagcgagaag gagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggtggagctggtgaagcacaagccc aaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacctgcgccccttcgtgga gaagtgtgcaaggccgacgacaaggagacctgcttcgcccaggagggaagaa gctggtggccgcccagccaggccgcccctgggctgggcagcggcgccggcgag cggcgggcgccgatctggtggaggtggcagtgaggagggggatccgctcgaac ggtgacctgcccctggttctggtcgctgctgccgctgcacaccgctcgcgcttct ctggaagacctgggtgggctgactgggttctgtctcctcgcaagttcaggttaccatg tgatcggtgcttgccttctcagttccgcgctgtaacatgcacgctcagatcaaaacc tctctgaccgctgaaacctgacaccgttctgctccttgcgtgcttctgtctttaa ccctatggtctgatccagaaaaccgacaccggttttctgcagacctacgacgac ctgctggctaaagactgccactgcatc
---	--

77 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:25	gatgctcataagtcgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagagaagaaaatttt aaggccctcggttatcgccctcgccaatactccagcagtcgccggtcgaggacc acgtgaagctcggtgaacgaagtgaccgagtttgccaagactgtgtggcggtgaatc cgccgagaactcgacagaagagcctccacacgctgttcggcgacaagctgtgcacc gtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccgactgtgcgcaaagcagg agccggaacggaacgaatgcttctgcaacataaggacgataaccctaactgcctc gcctggtccgacctgaggtcgacgtgatgtgcaccggtccacgacaacgaggaa acctttctaagaagtacgtgtacgagattgcgcggaggcacccttatttctacgcccc gaactgtgttcttcccaagcgggtacaaggctgcctttaccgaatgtgtccaggccgc cgataaggcggtgtcctgtgcccgaagctcgacgagttgcgcgatgaggggaagg cgctctccgctaagcagcgggtgaaatgtgcgagcctccagaagtgcggggagcgc gcctcaaggcctggcggtggcgccgtgtctcaacggttccgaaggccgaggtc gccgaagtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcac ggcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgcgaa aaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggatgtctgcgaaaagccctgtgga aaagtcccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgcgcacctccg tccctggccgaccttctgtggagtcgaaggatgtgtgcaagaactacgcagaagcc aaggacgtgttctgggaatgttctgtatgagtacgcccgcgcaccgggactactc ggtcgtgtcctgtcgcgactggcaaagacctacgaaacctctggagaagtgtg cgccgcccgggacctgcacgagtgctacgcaaagggtgttcgacgagttcaagcca ctgtcgaggagcctcagaacctgatcaagcagaactgcgaactgttcgagcagctg ggagagtacaaattccagaacgcgcttctcgtgctacaccaagaaggtcccca ggtgtccactccgacctggtggaagtgtccaggaacctgggaaggctcggtccaa gtgttgcaagcatcccgaggctaagcgcagtccctgcgcgaggactactgtcgtg gtgctgaatcagctgtgctgtccatgaaaagacccaggttcgcgacagagtacc aagtgtgtaccgaatcgctcgtaaccggcgccgtgctttccgactggaggtgg acgaaacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcacttccacgccgac atctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctggtgga gctgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcatggat gatttcgcgccctcgtggaagggtgtgaaagcggacgacaaggagactgtctcg ccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctgggctcgtag cgggtgagggggcagcgggtgtgaggatccggtaccgcgcgaacggggacca ctgtccgctcgggcccgggctgtgctcgtgtgcacacggtccgcgctcgtggaa gacctgggctgggcccattgggtgtgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtgc atcggcgctgcccagaccggtccggcggaacatgcacgcgcagatcaaga cgagcctgcaccgctgaagcccacacggtgccagcgccctgtgctgctccggcc agctacaatccatggtgtcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgtccagacc tatgatgactgttagccaaagactgccactgcata
---	--

78 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:26	gatgctcataagtcgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagaagaaaatttt aaggccctcgtgcttatcgccctcgcccaatacctccagcagtcgccggtcgaggacc acgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagactgtgtggcgatgaatc cgccgagaactcgcacaagagcctccacacgctgttcggcgacaagctgtgcacc gtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccgactgtgcgcaaagcagg agccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataaggacgataaccctaactgcctc gcctggtccgcccgtgaggtcgacgtgatgtgcaccggtccacgacaacgaggaa acctttcttaagaagtacgtgtacgagattgcgcggaggcacccttatttctacgcccc gaactgtgttcttcgccaagcggtagaaggctgcctttaccgaatgtgtccaggccgc cgataaggcggcttgctgtgcccgaagctcgacgagttgcgcgagtaggggaagg cgtcctccgctaagcagcggctgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgc gcctcaaggcctgggcccgtggcgccgtgtctcaacggttccgaaggccgaggtc gccgaagtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcac ggcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgcgaa aaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggatgctgcgaaaagccctgtgga aaagtcccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgcgcacctcccg tccctggccgcccgtatttcgtggagtcgaaggatgtgtgaagaactacgcagaagcc aaggacgtgttcttggaatgtttctgtatgagtacgcccgcgcacccggactactc ggtcgtgtcctgtcgcgactggcaaagacctacgaaacctctggagaagtgtg cgccgcccggaccgcacgagtgctacgcaaagggtgttcgacgagttcaagcca ctgtcagggagcctcagaacctgatcaagcagaactgcgaactgttcgagcagctg ggagagtacaaattccagaacgcgcttctcgtgcgtacaccaagaaggtcccca ggtgtccactccgacctggtggaagtgtccaggaaacctggaaaggtcggctcaa gtgttgcaagcatcccgaggctaagcgcagtcctcgcgcgaggactactgtccgtg gtgctgaatcagctgtgcgtgtccatgaaaagacccagtgccgacagagtgacc aagtgtgtaccgaatcgctcgtgaaccggcgccgctgttttccgactggagggtg acgaaacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttcacgcgcgac atctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctggtgga gcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcatggat gatttcgcgccctcgtggaaggtgtgtaaagcggacgacaaggagacttgcttcg ccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctgggctcgtag cggaggtggcggatcaggtggcggaggtagcggaggaggcggctctggcggaggt ggatcaggcggaggaggttcgggtggaggaggctcaggaggaggaggaagtga ggagggggatccggtaccgcgcgaacggggaccactgtccgctcgggcccggg cgttgctgcgctgtcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggcccatt gggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtgcccagc cagttccggcggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctga agcccgcacgggtccagcgcctgtcgtgcccgcagctacaatcccatggtg ctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtccagacctatgatgactgttagcca aagactgccactgcata
--	---

79 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:27	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcggagaagaaaattt taaggccctcgtgcttatcgcccttcgccaatacctccagcagtcgccggtcaggac cacgtgaagctcgtgaacgaagtgaaccgagtttgccaagacttggtggcgatga atccgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcggcgacaagctgtgc accgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccgactgctgcgcaaag caggagccggaacggaacgaatgcttctgcaacataaggacgataaacctaac ttgcctcgctggtccgccctgaggtcgacgtgatgtgcaccgcttccacgacaac gaggaaacctttctaagaagtacctgtacgagattgcgaggagcaccctatttct acgccccgaactgtgttcttcgccaagcgggtacaaggctgcctttaccgaatgtg ccaggccgccgataaggcggcttgctgctgccgaagctcgacgagttgcgcat gaggggaaggcgtcctccgtaagcagcggctgaaatgtgcgagcctccagaag ttcggggagcgcgcttcaaggcctgggctggcgcgctgtctcaacggttccc gaaggccgagttcgccaaggtgcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgc caccgaatgtgtcacggcgtatgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgg ccaagtacatctgcgaaaaccaggacagcatttcgtcaaagtgaaggaatgtg cgaaaagcccttgctggaagtcactgcatcgcggaagtggagaacgacga gatgcccgccgacctccctgcccggccgatttcgtggagtcgaaggatgtgtg caagaactacgcagaagccaaggacgtgttctgggaatgttctgtatgagtacgc ccgccgccaccggactactcggctgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaaccactctggagaagtgtgcgcccgcggaccgcacgagtgctacgcaa aggtgtcgacgagttcaagccactgtcgaggagcctcagaacctgatcaagcag aactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaatccagaacgcgcttctgt gcgtacaccaagaagggtccccagggtgtccactccgacctggtggaagtgtcc aggaacctgggaaagggtcggtccaagtgtgcaagcatcccgaggctaagcgc atgccctgcgcccaggactactgtccgtggtgctgaatcagctgtcgtgctccatg aaaagacccaggtgtccgacagagtgaccaagtgtgtaccgaatcgctcgtgaa ccggcgccgctgtttccgcactggagggtggacgaaacctacgtgccgaaggagt tcaacgcagaaaaccttactttccacgccgacatctgcactctgtccgagaaggag cggcagattaagaagcagactgccctgggtggagctgtgaaacacaagcctaagg ccaccaagagcagctgaaggccgtcatggatgatttcgcgcccttcgtggaaaa gtgtgttaaagcggacgacaaggagactgtctcgccaagaaggaaagaagct cgtggcagcgtcacaggccgcttgggctcgctagcgcacctgccccgcgtcca gctcctgcaccaggtaccgcgcgaacggggaccactgtccgctcgggcccggg cgttgcgtccgtctgcacaggctccgcgctcgctggaagacctgggctgggcca ttgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgcccga gccagttccggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgc ctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgcagctacaatcca tggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgactgtt agccaaagactgccactgcata
---	---

80 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:28	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagaagaaaatttaa ggccctcggtcttatcgcttcgcccataacctccagcagtcgccgttcgaggaccacgtg aagctcgtaacgaagtgaccgagtttgccaagactgtgtggcggaatgaatccgccga gaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgcgacaagctgtgcaccgtcgccacg ctgagagaaacttacggagagatggccgactgtgcgcaaagcaggagccggaacg gaacgaatgtctcctgaacataaggacgataaccctaactgcctcgctggtccgcct gaggtcgacgtgatgtgcaccgcttcacgacaacgaggaaacctttctaagaagtac ctgtacgagattgcgaggacccctatttctacgccccgaactgtgttcttcgccaag cggtaacaggctgcctttaccgaatgtgccaggccgcgataaggcggctgctgtg ccgaagctcgacgagttgcgcatgaggggaaggcgctcctccgtaagcagcggctga aatgtgcgagcctcagaagttcggggagcgcgcttcaaggcctgggctggcgcg cctgtctcaacggttccgaaggccgagttcgccgaaggtgcaagctggtcaccgacct gacgaaagtgcacaccgaatgtgtcacggcgatctgctggaatgcgccgatgacaga gccgatttggccaagtacatctgcgaaaaccaggacagcatttctgcaagctgaagga atgctgcgaaaagcccttgcgtgaaaagtccactgcacggaagtggagaacgac gagatgcccgcgacctcccgtccctggccgcccgttgcgtgagtcgaaggaatgtgtg aagaactacgcagaagccaaggacgtgttctgggaatgtttctgtatgtagtaccgccc cgccacccggactactcggtcgtgtcctgtgcgactggcaaagacctacgaaaccac tctggagaagtgtgcgcccgcggaccgcacgagtgctacgaaaggtgttcgac gagttcaagccactgttcgaggagcctcagaacctgatcaagcagaactgcgaactgttc gagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgcttctgtgcgtacaccaagaaggt ccccaggtgtccactccgaccctggtggaagtgtccaggaacctgggaaaggtcggct ccaagtgttgaagcatcccagggttaagcgcatgccctgcgcccaggactactgtccg tgggtctgaatcagctgtgcgtgtccatgaaaagaccccagtgctccgacagagtga agtgctgtaccgaatcgctcgtgaaccggcgccgctgttttccgactggaggtggacg aaacctacgtgccgaaggagttaacgcagaaaccttcaacttccacgcccagacatctgca ctctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctggtggagctgtgaaa cacaagcctaaggccacaaagagcagctgaaggccgtcatggatgatttcgcccgtt cgtggaaaagtgttgaagcggacgacaaggagactgtctcgccgaagaaggaaa gaagctcggtgcagcgtcacaggccgctctgggcctcgtagcgacctgccccgctc cagcaccgccccagcccctgctccgcaccagctcctgcaccagggtaccgctcgaa cggtgaccactgccctctgggtcctggtcgtgctgcgcctgcacaccgttcgcttct ggaagacctgggtgggctgactgggtctgtctcctcggaagttcaggtaccatgtgcat cgggtgctgccctctcagttccgctgtaacatgcacgctcagatcaaaacctctctgca ccgctgaaacctgacaccgttctgctcctgtgctgcttcttacaacctatgggtc tgatccagaaaaccgacaccggttttctgcagacctacgacgacctgtggctaaag actgccactgcatc
--	---

81 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:29	gatgtcataagtcgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagagaagaaaatttt aaggccctcggttatcgccctcgccaatacctccagcagtcgccgtcgaggacc acgtgaagctcggaacgaagtgaccgagttgccaagactgtgtggcgatgaatc cgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcggcgacaagctgtgcacc gtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccgactgtgtcgcaagcagg agccggaacggaacgaatgcttctgcaacataaggacgataaccctaactgtctc gctgtgtccgctgaggtgcagctgatgtgcaccggtccacgacaacgaggaa acctttctaagaagtacgtgtacgagattgcgcggaggcacccttatttctacgcccc gaactgtgttcttcccaagcgggtacaaggctgcctttaccgaatgtgtccaggccgc cgataaggcggtgtcgtgtccgaagctcgacgagttgcgcgagtaggggaagg cgtctccgctaagcagcgggtgaaatgtgcgagcctccagaagtgcggggagcgc gcctcaaggcctggcggtggcgcgctgtctcaacggttccgaaggccgagttc gccgaagtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcac ggcgtatgtgtgaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatgtcgaa aaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggatgtgtcgaaaagccctgtgga aaagtcccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgcgcacctccg tccctggccgctgatttcgtggagtcgaaggatgtgtgaagaactacgcagaagcc aaggacgtgttctgggaatgttctgtatgagtacgcccgcgcaccggaactctc ggtcgtgtcctgtgtcgactggcaaagacctacgaaacctctggagaagtgtg cgccgcccggaccgcacgagtgctacgcaaagggtgttcgacgagttcaagcca ctgtcgaggagcctcagaacctgatcaagcagaactgcgaactgttcgagcagctg ggagagtacaaattccagaacgcgcttctgtgctacaccaagaaggtcccca ggtgtccactccgacctggtggaagtgtccaggaaacctgggaaggctcggtcaa gtgttgcaagcatcccgaggctaagcgcagtccttcgcccaggagactactgtcgtg gtgctgaatcagctgtgctgtccatgaaaagacccagtgccgacagagtgcac aagtgtgtaccgaatcgctcgtaaccggcgccgtgttttccgactggaggtgg acgaaacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttcacgcccac atctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctggtgga gcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcatggat gatttcgcgcccttcgtgaaaagtgtgttaaagcggacgacaaggagactgtctcg ccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctgggctcgtag cgcacctgccccgcctccagccccagctcctgcacctgtctccagcaccagctcctgc accagctccagcccctgcacctgcacctgcctccagccccagctcctgcacctgtcc agcaccaggtaccgcgcgaacggggaccactgtccgctcgggcccgggctgtgt gccgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgc tgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgcccagccagttcc ggcgcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgctgaagccc acacggtgccagcgcctgtcgtgcccgcagctacaatcccatggtgtcattca aaagaccgacaccggggtgtcgtccagacctatgatgactgttagccaaagactg ccactgcata
--	--

5 10 15	82 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:30	gatgctcataagtcgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagagaagaaaatttt aaggccctcggttatcgccctcgccaatacctccagcagtcgccggtcgaggacc acgtgaagctcggtgaacgaagtgaccgagtttgccaagactgtgtggcggtgaatc cgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcggcgacaagctgtgcacc gtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccgactgtgcgcaaagcagg agccggaacggaacgaatgcttctgcaacataaggacgataaccctaactgtcctc gcttggtccgacctgaggtcgacgtgatgtgcaccggtccacgacaacgaggaa acctttcttaagaagtacctgtacgagattgcgcggaggcacccttatttctacgcccc gaactgtgttcttcccaagcgggtacaaggctgcctttaccgaatgtgtccaggccgc cgataaggcggtgtcctgtgcccgaagctcgacgagttgcgcgatgaggggaagg cgtctccgctaagcagcggtgaaatgtgcgagcctccagaagtgcggggagcgc gcctcaaggcctgggctggtgcgcgctgtctcaacggttccgaaggccgaggtc gccgaagtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcac ggcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatgtcgaa aaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggatgtctcgaaaagccctgtgga aaagtccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgcgcacctccg tccctggccgaccttcgtggagtcgaaggatgtgtgaagaactacgcagaagcc aaggacgtgttctgggaatgttctgtatgagtacgcccgcgcaccggaactactc ggtcgtgtcctgtgcgactggcaaagacctacgaaacctctggagaagtgtg cgccgcccggaccgcacgagtgctacgcaaagggtgttcgacgagttcaagcca cttgcgaggagcctcagaacctgatcaagcagaactgcgaactgttcgagcagctg ggagagtacaaattccagaacgcgcttctcgtgcgtacaccaagaaggtcccca ggtgtccactccgacctggtggaagtgtccaggaacctggaaaggtcggtccaa gtgttgcaagcatcccgaggctaagcgcagatgccctgcgcgaggactactgtccgtg gtgctgaatcagctgtgcgtgctccatgaaaagacccagtgctcgacagagtacc aagtgtgtaccgaatcgctcgtaaccggcgccgtgctttccgactggagggtg acgaaacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttcacgcccac atctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctggtgga gctgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcatggat gatttcgcgcccttcgtgaaaagtgtgttaaagcggacgacaaggagacttgcttcg ccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctgggctcgtag cgaagcagcagccaaagaagcagccgcaaaagaagcagccgctaaggaggcc gcagcaaagggtaccgcgcgaacggggaccactgtccgctcgggcccggtt gctgccgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccgggtt tgctgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgcccagccagt tccgggcggaacatgcacgcgagatcaagacgagcctgcaccgctgaagc ccgacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatccatggtgtca tcaaaagaccgacaccgggtgtcgtcagacctatgatgactgttagccaaag actgccactgcata
------------------------------	---	---

83 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:40	gacgccacacaagagcgaggtggcccaccggttaaggacctggcgaggagaacttc aaggccctggtgctgatcgccctcgcccagctacctgcagcagtcaccttcgaggaccac gtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgctggtggcgagcagagc gccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtgg ccacctgcgggagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccg agcggaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgccccggtggt gcgggccgaggtggacgtgatgtgcaccgcctccacgacaacgaggagaccttctg aagaagtacctgtacgagatcgccggcggcacccctacttctacgccccgagctgct gttcttcgccaagcgggtacaaggccgccttcaccgagtgctgcaggccgcccagaagg ccgctgctgctgcccagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagc gccaagcagcggctgaagtgcgcccagcctgcagaagttcgcgagcgggccttaag gcctgggctggtggccggtgagccagcgggttcccaaggcagtgctgcgaggtga gcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgct ggagtgccgacgacggggccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggaca gcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagccctgctggagaagagccact gcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgcgacctgcccagcctggccgccc acttcgtggagagcaaggacgtgtgaagaactacgcccagggccaaggacgtgttct gggcatgttctgtacgagtagcggcgccgaccccgactacagcgtggtgctgctgct gcggtggccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgcgcgcccgcgaccc ccacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggagccccag aacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtagaagttccaga acgacctgctggtgcgttacaccaagaaggtgcccaggtgagcaccaccctggt ggaggtgagccgaacctgggcaaggtggcagcaagtgctgcaagcaccggagg ccaagcggatgccctgcgcccaggactacctgagcgtggtgctgaaccagctgtgctg ctgcacgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgcaccgagagcctg gtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacgagacctacgtgcccgaagg agttcaacgccgagaccttcacctccacgcccacatctgcacctgagcgagaaggag cggcagatcaagaagcagaccgcccctggtggagctggtgaagcacaagcccaaggc caccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccccttcgtggagaagtgt gcaaggccgacgacaaggagacctgcttcgcccaggaggggcaagaagctggtggcc gccagccaggccgcccctgggctgggcagcggcgccgaggcgagcggcgccg gatctggtggaggtggcagtgaggaggggatccgcgcgcaacggggaccactgtc cgctcgggcccggtgtgctgctgcacacggtccgcgctgctggaagacctg ggctgggctgattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgc gtgcccagccagttccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgca ccgctgaagcccagcaggtgcccagcgcctgctgctgcccgcagctacaatccc atggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgactgttag ccaaagactgccactgcata
--	---

84 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:55	gatgcacacaagagtgaggtgctcatcggttaaagattgggagaagaaaattcaaa gccttggtgtgattgaccttgctcagtatctcagcaggcccatTTgaagatcatgtaaaatt agtgaatgaagtaactgaattgcaaaaacatgtgtgctgatgagctgaaaattgtg acaaatcacttcatacccttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttctgc aacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatg tgactgctttcatgacaatgaagagacattttgaaaaatacttatgaaattgccaga agacatccttactttatgccccggaactcctttcttgctaaaaggatataaagctgctttaca gaatgttgcaagctgctgataaagctgctgctgttgccaaagctcgatgaactcggg atgaaggaaggtctgctgctgcaaacagagactcaagtgtgccagctccaaaaatttg gagaaagagcttcaaagcatgggcagtagctgcctgagccagagattcccaaagct gagttgcagaagttccaagtagtgacagatcttccaaagtccacacggaatgctgcc atggagatctgctgaatgtgctgatgacaggcgacctgccaagtatatctgtgaaaat caagattcgatctccagtaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctgcttgaaaaatcc cactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctgacttgcccttagctgctgat tttgtgaaagtaaggatgtttgcaaaaactatgctgaggcaaggatgtcttctgggcat gttttgatgaatatgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgagacttgcca agacatatgaaacctctagagaagtgtgtgccgtgcagatcctcatgaatgctatgc caaagtgttcgatgaattaaacctctgtggaagagcctcagaatttaatacaaaaaatt gtgagcttttgagcagcttggagagtacaaattccagaatgcgctattagttcgttacacca agaaagtacccaagtgtcaactccaactctgtagaggtctcaagaaacctaggaaaa gtgggcagcaaatgtgtaaacatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaagacta tctatccgtggtcctgaaccagtattgtgtgtgcatgagaaaacgccagtaagtgcaga gtcaccaaatgctgcacagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaag tcgatgaaacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttcagatataat gcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcactgttgagctcgtg aaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgatttcgcag ctttttagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctgctttgccgaggagggtgta aaaaactgttgctgcaagtcaagctgccttaggcttaggcagcgcgcgcgcgcgagc ggcgcgcgcgatctggtggagggtggcagtgaggagggggatccggcgcgcgcg cagcgcgcgcgcgatctggtggagggtggcagtgaggagggggatccgcgcgca acggggaccactgtccgctcgggcccggtgtgctcgcgtgcacacggtccgcgcg tcgctggaagacctgggctgggcccgaattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagtgc catgtgcatcgcgctgcccagccagttccggcgcgcaaacatgcacgcgcagatc aagacgagcctgcaccgcctgaagcccagacaggtgccagcgccctgctgctgccc gccagctacaatccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagac ctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata
--	---

85 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:56	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagattgggagaagaaaattc aaagccttggtgtgattgcctttgctcagtatcttcagcaggccccattgaagatcat gtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgtgttgctgatgagtcag ctgaaaattgtgacaaatcacttcatacccttttgagacaaattatgcacagttgca actcttcgtgaaacctatggtgaaatggctgactgctgtgcaaaaacaagaacctgag agaaatgaatgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggt gagaccagaggttgatgtgatgtgcactgcttttcagacaatgaagagacattttga aaaaatacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttatgccccggaactcctt tctttgctaaaaggtataaagctgctttacagaatgttgccaagctgctgataaagct gcctgcctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgcc aaacagagactcaaggtgcccagctccaaaaatttgagaaagagctttcaagc atgggcagtagctcgctgagccagagatttccaaagctgagttgcagaagttc caagttagtgacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatggagatctgct tgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaatcaagattc gatctccagtaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctctgttgaaaaatcccactg cattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctgactgaccttcattagctgctgatt tgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaactatgctgaggcaaaggatgtcttctctggc atgtttttgtatgaatgatcaagaaggcatcctgattactctgctgctgctgctgaga cttgccaagacatatgaaacctctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcat gaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaacctctgttggaagagcctcagaattt aatcaaaaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagtagacaaattccagaatgc gctattagttcgttacaccaagaaagtacccaagtgtcaactccaactctgttagag gtctcaagaaacctagggaaaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctgaagcaa aaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggctcgaaccagttatgtgttg catgagaaaaacgcagtaagtgcagagtcaccaaagtctgcacagaatccttg tgaacaggcgacctgcttttcagctctggaagtcatgaaacatacgttccaaag agtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacacatttctgagaaggag agacaaatcaagaaacaaactgcacttgttgagctcgtgaaacacaagcccaag gcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgatttcgcagctttttagagaag tgctgcaaggctgacgataaggagacctgctttgccgaggagggtaaaaaactgt tgctgcaagtcaagctgccttaggcttagcacctgccccgctccagcaccgcgcc agccccgtctccgcaccagctcctgcaccagcgcgcaacggggaccactgtccg ctcgggccccggcggttgctgcccgtctgcacacgggtccgcgctgctggaagacct gggctgggcccattgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcg gcgctgcccagccagttccggggcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacg agcctgcaccgcctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgctgcccgc agctacaatccatggtgctcattcaaaagaccgcacccgggtgtcgctccagac ctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata
--	--

86 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:40 (Optimización por codón 1)	gatgcacacaagagtgaggtgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaaattcaaa gccttgggtgtgattgccttggctcagtatctcagcagtcctccattgaagatcatgtaaaatta gtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgtgtgctgatgagtcagctgaaaattgtga caaatacacttcatacccttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctat gggtgaaatggctgactgctgtgcaaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttctgcaa caciaagatgacaacccaaccccgattgggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgctttcatgacaatgaagagacattttgaaaaatacttatgaaattgccagaag acatccttactttatgccccggaactcctttcttgctaaaaggataaaagctgttttacaga atgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaaagctcgatgaactcgggatg aagggaaggctcgtctgccaacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttga gaaagagcttcaagcatgggcagtagctgcctgagccagagatttccaaagctga gtttgcagaagttccaagttagtgcagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatg gagatctgctgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaatca agattcgatctccagtaaacgaaggaatgctgtgaaaaacctctgttgaaaaatccca ctgcatgcccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctgactgaccttagctgctgatttt gttgaaagtaaggatgtttgcaaaaactatgctgaggcaaaggatgcttctgggcatgtt ttgtatgaatatgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgagacttgccaag acatatgaaccactctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctcatgaatgctatgcc aagtgttcgatgaatttaaactctgtggaagagcctcagaatttaacaaacaaattgtg agcttttgagcagctggagagtacaaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaag aaagtacccaagtgtaactccaactctgttagaggtctcaagaaacctaggaaaagt gggcagcaaatgtgttaacatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatc tatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgtcatgagaaaacgccagtaagtgcagagat caccaaatgctgcacagaatccttggtgaacaggcgaccatgctttcagctctggaagtc gatgaaacatacgttcccaaagagttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatg cacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcactgttgagctcgtga aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgatttcgcagc ttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctgctttgccgaggagggtaa aaaactgttgctgcaagtcaagctgccttaggcttaggcagcggcgggcgggcagcg gcgggcgcgatctggtggaggtggcagtgaggagggggatccgcgcgcaacggg gacctgtccgctcgggcccggtgtgctgcctgtgcacacggctccgcgcgtcgtg gaagacctgggctggccgattgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtaccatgtg catcggcgctgcccagccagttccggcggaacatgcacgcgcagatcaagac gagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgccagc tacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtccagacctatgat gactgttagccaagactgccaactgcata
--	---

87 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:40 (Optimización por codón 2)	gacgcccacaagagcgaggtggccacagattcaaggacctggcgaggaaa acttcaaggccctggtgctgatcgcttcgcccagctacgtgagcagagcccctcg aggaccacgtgaagctggtcaacgaagtaccgagttcgcaagacctgctgg ccgacgagagcgccgagaactgacgacaagagcctgcacacctgttcggcgac aagctgtgcaccgtggccacctgctgggaaacctacggcgagatggccgactgt gcgccaagcaggaacccgagcgaacgagtgcttcctgcagcacaaggacgac aaccccaacctgcccagactcgtgcggcccgaggtggacgtgatgtgcaccgcctt ccacgacaacgaggaaccttctgaagaagtacctgtacgagatgcgcagacg gcacccctacttctacgccccgagctgctgttctcgcaagcgttacaaggccgc cttcaccgagtgctgccaggccgataaggccgctgctgctgcccagctgg acgagctgagagatgagggcaaggccagctccgccaagcagcggctgaagtgc gccagcctgcagaagttcggcgagcgggcttaaggcttgggctgtggccggct gagccagagattcccaaggccgagtttgcgaggttccaagctggtcaccgac ctgaccaaggtgcacaccgagtggtgtcacggcgacctgtggaatgcgcccagc acagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagc aagctgaaagagtgctgcgagaagcccctgctggaaaagagccactgtatgcc gaggtgaaaacgacgagatgcccgtgacctgcccagcctggccgacgttc gtggaagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggatgtgttcttg gcatgttctgtatgagtacggcgacacacccgactacagcgtggtgctgctgc tgcggctggccaagacctacgagacaacctggaaaagtgtgcgcccgtgccg accccccagagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagccttggtggaagaa cccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggagagaca agttccagaacgccctgctcgtgcgttacaccaagaaagtgtcccaggtgtccac ccccacctggtcgaagtgtccggaacctgggcaagtgggacgcaagtgtctgc aagcacctgaggccaagcggatgccctgcgcccaggactacctgtccgtggtgc tgaaccagctgtcgtgctgcacgagaaaaccccgttcgacagagtgaccaa gtgctgtaccgagagcctgggtcaacagacggccctgcttcagcgccttggaaagg acgagacatacgtgcccgaagagtgcaacgcccagacattcaccttcacgcccga catctgcacctgagcgagaaagagcggcagatcaagaagcagaccgccctggt cgagctggtcaagcacaagccaaggccaccaaaagacagctgaaggccgtga tgacgacttcgccccttcgtcgagaagtgttgcaaggccgacgacaaagagac atgcttcgccaagagggcaagaaactggtggccgctctcaggccgccctggga ctgggatctggcggcggaggaagcggaggcggaggatctgggggaggcggctc tggcggagggggatccgcccagaaatggcgaccactgtcccctgggcccctggccg gtgttcagactgcacacagtgccggccagcctggaagatctgggctgggcccatt gggtgctgagccccagagaagtgcaggtcacaatgtgatcggcgctgcccag ccagttcagagccgccaacatgcacgcccagatcaagaccagcctgcaccggct gaagcccgcacccgtgcctgcccctgttgcgtgcccgcagctacaacccatgg tgctgattcagaaaaccgacaccggtgtccctgcagacctacgacgatctgctg gccaaggactgccactgcatc
--	---

5 10 15	88 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:48	gatgcacacaagagtgaggtgctcatcggttaaagattgggagaagaaaattcaaa gccttggttgattgaccttgctcagtatctcagcaggcccatTTgaagatcatgtaaaatt agtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgtgtgctgatgagctgaaaattgtg acaaatcacttcatacccttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttctgc aacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagagggtgatgtgatg tgactgctttcatgacaatgaagagacattttgaaaaatacttatgaaattgccaga agacatccttactttatgccccggaactcctttcttgctaaaagggtataaagctgctttaca gaatgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaaagctcgatgaactcggg atgaaggaaggtctgctgccaacagagactcaagtgtgccagctccaaaaatttg gagaaagagcttcaaagcatgggcagtagctgcctgagccagagattcccaaagct gagttgcagaagttccaagtagtgacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgcc atggagatctgctgaatgtgctgatgacaggcgacctgccaagtatatctgtgaaaat caagattcgatctccagtaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctgttgaaaaatcc cactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctgacttgcccttagctgctgat tttgtgaaagtaaggatgtttgcaaaaactatgctgaggcaaggatgtcttctgggcat gttttgatgaatatgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgagacttgcca agacatatgaaacctctagagaagtgtgtgccgtgcagatcctcatgaatgctatgc caaagtgttcgatgaattaaacctctgtggaagagcctcagaatttaacaaacaaaatt gtgagcttttgagcagctggagagtacaaattccagaatgcgctattagttcgttacacca agaaagtacccaagtgtcaactccaactctgtagaggtctcaagaaacctaggaaaa gtgggcagcaaatgttgaacatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaagacta tctatccgtgtcctgaaccagttatgtgtgtgcatgagaaaacgccagtaagtacaga gtcaccaaatgctgcacagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaag tcgatgaaacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatat gcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcactgttgagctcgtg aaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgatttcgcag ctttttagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctgctttgccgaggagggtta aaaaactgttgctgcaagtcaagctgccttaggcttaggcagcgcgcgcgcgcgagc ggcgcgcgcgatctggtggagggtggcagtgaggagggggatccgcgcgcaacgg ggaccactgtccgctcgggccggcggttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgt ggaagacctgggtggcggttggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgt gcatcggcgctgcccagccagttccggcggaacatgcacgcgcagatcaaga cgagcctgcaccgcctgaagcccacacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcag ctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacggggtgctgctccagacctatgat gactgttagccaagactgccaactgcata
------------------------------	---	---

90 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:60 (Optimización por codón 1)	gatgcacacaagagtgaggttgcctcatcggtttaagattgggagaagaaaatttcaa agccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctccattgaagatcatgtaaa attagtgaaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgtgtgctgatgagtcagctgaaaat tgtgacaaatcacttcatacccttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtga aacctatggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatg cttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggtt gatgtgatgtgactgctttcatgacaatgaagagacattttgaaaaatacttatatga aattgccagaagacatccttactttatgccccggaactcctttcttgctaaaaggataa agctgctttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgctgctgttgccaaagctc gatgaactcgggatgaagggaaggctcgtctgccaacacagagactcaagtgtgcca gtctccaaaatttgagaaagagcttcaaagcatgggcagtagctgcgctgagcca gagatttccaaagctgagttgcagaagttccaagtagtgacagatcttaccaaagtc cacacggaatgctgcatggagatctgctgaatgtgctgatgacagggcgaccttgc caagtatatctgtgaaaatcaagattcgatctccagtaaactgaaggaatgctgtgaaa aacctctgttgaaaaatcccactgcattgccgaagtggaatgatgagatgcctgct gactgaccttagctgctgattttgtgaaagtaaggatgttgcaaaaactatgctgag gcaaaggatgtctcctgggcatgtttgtatgaatatgaagaaggcatcctgattactct gtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatgaaacctctagagaagtgtgtgcc gctgcagatcctcatgaatgctatgccaagtggttcgatgaatttaaacctcttggaag agcctcagaatttaatacaaaaaattgtgagcttttgagcagcttgagagtagacaaat ccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccaagtgtcaactccaactct ttagaggtctcaagaaacctaggaagtgggcagcaaatgttgtaaactcctgaa gcaaaaagaatgcctgtgcagaagactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtg ttgcatgagaaaacgccagtaagtacagagtcaccaaatgctgcacagaatccttgg tgaacaggcgacatgctttcagctctggaagtcgatgaaacatacggtcccaaagag ttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacacttctgagaaggagagac aatcaagaaacaaactgcactgttgagctcgtgaaacacaagcccaaggcaaca aaagagcaactgaaagctgttatggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaag gctgacgataaggagacctgctttgccgaggagggtaaaaaactgttgctgcaagtca agctgccttaggcttaggcagcgccggcgccgagcgccggcgccggatctggtg gaggtggcagtgaggagggggatccggcgccggcgccgagcgccggcgccggat ctggtggaggtggcagtgaggagggggatccgcgcgaacggggaccactgtccg ctcgggcccggcggtgtgctgctgcacacggtccgcgcgctgctggaagacctgg gctgggcccattgggtgtgtgcgcacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgc gtgcccagccagttccggcgccgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgc accgcctgaagcccacacgggtccagcgccctgtgctgctccgcccagctacaatc ccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgactgt tagccaaagactgccactgcata
--	---

5 10 15	91 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:70	gacgcccacaagagcgaggtggcccaccggttaaggacctgggagaggaga acttaaggccctgggtgctgatcgccctcgcccagctacgtgacgagtcgcccttcga ggaccacgtgaagctgggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgctggc cgacgagagcgccgagaactgagacaagagcctgcacacctgttcggcgaca agctgtgcaccgtggccacctgcgggagacctacggcgagatggccgactgctg cgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttctgcagcacaaggacgaca accccaacctgccccggctgggtcgccccgaggtggacgtgatgtgcaccgccttc cacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgagatgccccggcg caccctacttctacgccccgagctgctgttctcgccaagcgggtacaaggccg ttcaccgagtgctgccaggccgacgaaggccagcagcgccaagcagcggtgaagt acgagtgctgggacgagggcaaggccagcagcgccaagcagcggtgaagt cgccagcctgcagaagttcggcgagcgggccttaaggcctgggcccgtggccg gctgagccagcgggtcccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtgacc gacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgctggagtgcgc gacgaccgggcccagacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcag cagcaagctgaaggagtgctgcgagaagcccctgctggagaagagccactgcat cgccgaggtggagaacgacgagatgcccggcagacctgcccagcctggccgccc acttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggacgtgtt cctgggcatgttctgtacgagtagccccggcgccaccccgactacagcgtgggtc tgtgtgtcggttgccaagacctacgagaccacctggagaagtgtgcgccc cgccgacccccacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagcccctggtg gaggagccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggc gagtacaagttccagaacgccctgctggtgcggtacaccaagaaggtgcccagg tgagccccccacctggtggaggtgagccggaacctgggcaaggtgggcagca agtgtgtcaagccccgaggccaagcggatgccctgcgccgaggactacctga gcgtggtgctgaaccagctgtgcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgaccg ggtgaccaagtgtgcaccgagagcctgggtgaaccggcgccctgcttcagcgcc ctggaggtggacgagacctacgtgcccaggagttcaacgccgagaccttcacctt ccacgccgacatctgcacctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcaga ccgccctggtggagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctg aaggccgtgatggacgacttcgccgcttcgtggagaagtgtgcaaggccgacg acaaggagacctgcttcgccgaggagggaagaagctggtggccgcccagccag gccgccctgggctgggagcggcgggcgccgagcggcgccgagcggatctgg tggaggtggcagtgaggagggggatccgctcgcaacgggtgacctgcctctg ggtcctggtcgctgctgccgctgcacaccgttcgcttcttgaagacctgggtt gggctgactgggttctgtctcctcggaagttcaggtaccatgtgcatcggtgcttc ccttctcagttccgctgctaacatgcacgcttgatcaaaacctcttcgaccgcct gaaacctgacaccgttctgctcctgctgcttcctgcttcttacaacctatggtctg atccagaaaaccgacaccggtgttctctgcagacctacgacgacctgctggctaa agactgccactgcatc
------------------------------	---	--

5	92	HSA (C34S) – GS-(GGGGS) ₈ GDF15 (delección 4)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
10	93	HSA (C34S)- GS-(GGGGS) ₈ - GDF15 (delección 5)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
15	94	etiqueta de 6x histidinas HSA (C34S)- GS-(GGGGS) ₈ - GDF15 sitio HRV3C	EFHHHHHHDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQ SPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLC TVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLV RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADP HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCA EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSAL EVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVK HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SLEVLFGQ PARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
20			

95 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:92 (Optimización por codón 1)	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTT GGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTG CTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAAAT TAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTG ATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTT TTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAG AGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAAC CTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCAC TGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTA TATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAAT GTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAG CTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAA ACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAA GAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAG ATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGAC AGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTAT ATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAA TGCTGTGAAAAACCTCTGTTGAAAAATCCCACTGCATTGC CGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCCTTCAT TAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACT ATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTAT GAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCT GCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGT GCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTA ATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTAC AAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTA CCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAA CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAG CAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTC CTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAG TGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACA GGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATAC GTTCCCAAAGAGTTTAAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCA GATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAA ACAAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGG CAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTGCA GCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGAC CTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAATTGTTGCTGCAAGTC AAGCTGCCTTAGGGCTTGGAAGCGGCGGAGGGGGGAGTG GCGGCGGTGGCTCCGGGGGGGGCGGATCCGGCGGAGGG GGCAGCGGGGGTGGAGGGAGTGGCGGGGGAGGATCAGG GGGAGGAGGATCAGGAGGGGGCGGAAGTGATCATTGCCCT CTCGGGCCCGGACGGTGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGG CTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCC CCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCC CAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAA CCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCC CTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTC AAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGA CTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
--	--

5	96	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:7	GGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACGTCATA
	97	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:8 (Optimización por codón 1)	GACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
	98	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:8 (Optimización por codón 2)	GATCATTGCCCTCTCGGGCCCCGGACGGTGTTGCCGCCTCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCAGATAAAAACAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
	99	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:8 (Optimización por codón 3)	GATCATTGTCCCCTTGGAACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCTTCGCAATTCGGGCGCGCAATATGCACGCCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
	100	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:9 (Optimización por codón 1)	CACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCACCTGCATA

5	101	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:9 (Optimización por codón 2)	CATTGCCCTCTCGGGCCCCGGACGGTGTGTCGCGCCTCCACA CTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCGGACTG GGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTG GCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGC CCAGATAAAAACCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACG GTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCA TGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCA GACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
	102	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:9 (Optimización por codón 3)	CATTGTCCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCCTGCACAC TGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGG GTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCG GCGCCTGTCCCTTCGCAATTCCGGGGCCGCGAATATGCACGC CCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCCGACACTG TGCCTGCTCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATG GTGCTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAGA CGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
	103	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:10 (Optimización por codón 1)	TGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGG TCCGCGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGT GCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGC GCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGGCGGCAACATGCACGCGC AGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGT GCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATG GTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGA CCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
10	104	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:10 (Optimización por codón 2)	TGCCCTCTCGGGCCCCGGACGGTGTGTCGCGCCTCCACACTG TGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCGGACTGGGT GCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCG CCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCA GATAAAAACCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTG CCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGG TGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACC TATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
	105	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:10 (Optimización por codón 3)	TGTCCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCCTGCACACTGT GCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTG CTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCG CCTGTCCTTCGCAATTCCGGGGCCGCGAATATGCACGCCCA GATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCCGACACTGTGC CTGCTCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTG CTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTA TGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
20	106	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:11 (Optimización por codón 1)	TGCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTGGAAGACCT GGGCTGGGCGGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGC AAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTTC CGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCT GCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCT GCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAA AGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACT TGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA

5

107	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:11 (Optimización por codón 2)	TGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTG GATGGGCGGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAG TCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGC CGCTAACATGCACGCCCAGATAAAAAACCAGCCTGCACCG CCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCC CGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGAC ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCA AAGACTGCCACTGCATA
108	ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:11 (Optimización por codón 3)	TGTCGCCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTC GGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCA AGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCCTTCGCAATTCCG GGCCGCGAATATGCACGCCCAGATCAAGACCTCCCTGCA TCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATGCTGTGT GCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACC GATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTG GCCAAGGACTGCCATTGCATC

109 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:60 (Optimización por codón 2)	GATGCGCACAAAGTCGGAAGTGGCCCATCGCTTTAAGGACCT GGGAGAAGAGAACTTCAAGGCCCTGGTCCTGATCGCGTTC GCCCAGTACCTCCAGCAGTCCCCGTTTGAGGACCACGTCAA GCTTGTGAACGAAGTGACCGAGTTCGCAAAGACTTGTGTGG CCGATGAGTCCGCCGAAAAGTGGCACAAGTCCCTGCACAC CTTGTTCCGAGACAAGCTGTGCACCGTCGCGACTTTGCGG GAGACTTACGGCGAAATGGCGGACTGCTGCGCAAAGCAGG AGCCCGAAAGGAACGAGTGCTTCCTGCAACACAAGGACGA CAACCCGAACCTTCCGAGACTCGTGCGGCCTGAGGTGCAC GTGATGTGCACTGCATTCCATGATAACGAAGAAACATTCT GAAGAAGTACCTGTATGAAATTGCCAGACGCCACCCGTA TCTACGCCCCCGAACTGCTGTTCTTCGCCAAGAGATACAAG GCCGCCTTTACCGAATGTTGTCAAGCCGCCGATAAGGCAGC GTGCCTGCTGCCGAAGTTGGACGAGCTCAGGGACGAAGGA AAGGCCTCGTCCGCCAAGCAGAGGCTGAAGTGCGCGTCGC TCCAGAAGTTTGGAGAGCGGGCTTTTAAGGCCTGGGCAGT GGCTAGGTTGAGCCAGAGGTTCCCCAAGGCGGAGTTTGCC GAAGTGTCCAAGCTCGTGACTGACCTGACTAAAGTCCATAC CGAATGCTGCCACGGCGATCTGCTCGAATGCGCAGATGAC CGGGCGGATTTGGCCAAGTACATTTGCGAAAACCAAGACTC CATAAGCTCCAAGCTGAAGGAGTGCTGTGAAAAGCCTCTGC TCGAGAAGTCCCAGTGTATCGCCGAGGTGGAGAACGACGA AATGCCGCGCAGACCTCCCTAGCCTGGCAGCCGACTTCGTC GAATCCAAGGACGTGTGCAAGAACTACGCCGAAGCGAAGG ACGTGTTCTGGAATGTTCTGTACGAGTACGCCAGACGG CATCCAGACTACTCCGTGGTGCTTCTCTTGCGGCTGGCCAA GACTTATGAAACGACCCTGGAGAAATGTTGCGCTGCTGCTG ACCCACACGAGTGCTACGCCAAAGTGTTGACGAGTTTAAG CCTCTCGTGGAGGAACCCAGAACCTCATCAAGCAGAACTG CGAAGTTTTCGAGCAGCTCGGGGAGTACAAGTTCCAAAACG CGCTGCTTGTCCGCTACACCAAGAAAGTGCCGCAAGTGTCC ACACCGACCCTCGTGGAAGTGTCAGGAACCTGGGCAAAG TCGGAAGCAAATGTTGCAAGCACCCCGAAGCCAAGCGCAT GCCGTGCGCAGAGGACTACCTTTCGGTGCTGTTGAACAG CTCTGCGTCCTGCACGAAAAGACCCCGGTGTCAGACCGCG TGACCAAGTGCTGTACCGAAAGCCTCGTGAATCGGCGCCC CTGCTTCTCGGCCCTGGAGGTGGACGAACTTACGTGCCG AAAGAGTTCAACGCGGAAACCTTACCTTTCATGCCGATAT CTGCACCTGTCCGAGAAGGAGCGGCAGATCAAGAAGCAG ACCGCCCTGGTGGAGCTTGTGAAACACAAGCCGAAGGCCA CTAAGGAACAGCTGAAGGCCGTCATGGACGATTTGCTGCC TTCGTCGAGAAGTGCTGCAAGGCCGACGACAAGGAGACTT GCTTCGCTGAAGAAGGGAAGAAGCTTGTGGCCGCTAGCCA GGCTGCACTGGGACTGGGTAGCGGTGGAGGGGGATCAGG GGGTGGTGGATCGGGAGGAGGAGGATCAGGAGGTGGCGG CTCAGGAGGAGGCGGATCAGGCGGTGGAGGATCCGGAGG CGGAGATCGGGTGGAGGAGGCTCAGCGAGGAACGGGGA TCATTGTCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACA CTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTG GGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATC GGCGCCTGTCTTCGCAATTCCGGGCCGCGAATATGCACG CCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACT GTGCCTGCTCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCAT GGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAG ACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
---	---

110 ácido nucleico que codifica Sec. con núm. de ident.:92 (Optimización por codón 2)	GATGCGCACAAAGTCGGAAGTGGCCCATCGCTTTAAGGACCT GGGAGAAGAGAACTTCAAGGCCCTGGTCCTGATCGCGTTC GCCCAGTACCTCCAGCAGTCCCCGTTTGAGGACCACGTCAA GCTTGTGAACGAAGTGACCGAGTTCGCAAAGACTTGTGTGG CCGATGAGTCCGCCGAAAAGTGGCACAAGTCCCTGCACAC CTTGTTCCGAGACAAGCTGTGCACCGTCGCGACTTTGCGG GAGACTTACGGCGAAATGGCGGACTGCTGCGCAAAGCAGG AGCCCGAAAGGAACGAGTGCTTCCTGCAACACAAGGACGA CAACCCGAACCTTCCGAGACTCGTGCGGCCTGAGGTGCAC GTGATGTGCACTGCATTCCATGATAACGAAGAAACATTCT GAAGAAGTACCTGTATGAAATTGCCAGACGCCACCCGTA TCTACGCCCCCGAACTGCTGTTCTTCGCCAAGAGATACAAG GCCGCTTTACCGAATGTTGTCAAGCCGCCGATAAGGCAGC GTGCCTGCTGCCGAAGTTGGACGAGCTCAGGGACGAAGGA AAGGCCTCGTCCGCCAAGCAGAGGCTGAAGTGCGCGTCGC TCCAGAAGTTTGGAGAGCGGGCTTTTAAGGCCTGGGCAGT GGCTAGGTTGAGCCAGAGGTTCCCAAGGCGGAGTTTGCC GAAGTGTCCAAGCTCGTGACTGACCTGACTAAAGTCCATAC CGAATGCTGCCACGGCGATCTGCTCGAATGCGCAGATGAC CGGGCGGATTTGGCCAAGTACATTTGCGAAAACCAAGACTC CATAAGCTCCAAGCTGAAGGAGTGCTGTGAAAAGCCTCTGC TCGAGAAGTCCCAGTGTATCGCCGAGGTGGAGAACGACGA AATGCCGCGCAGACCTCCCTAGCCTGGCAGCCGACTTCGTC GAATCCAAGGACGTGTGCAAGAACTACGCCGAAGCGAAGG ACGTGTTCTGGGAATGTTCTGTACGAGTACGCCAGACGG CATCCAGACTACTCCGTGGTGCTTCTCTTGCGGCTGGCCAA GACTTATGAAACGACCCTGGAGAAATGTTGCGCTGCTGCTG ACCCACACGAGTGCTACGCCAAAGTGTTGACGAGTTTAAAG CCTCTCGTGGAGGAACCCAGAACCTCATCAAGCAGAACTG CGAAGTTTTCGAGCAGCTCGGGGAGTACAAGTTCCAAAACG CGCTGCTTGTCCGCTACACCAAGAAAGTGCCGCAAGTGTCC ACACCGACCCTCGTGGAAGTGTCAGGAACCTGGGCAAAG TCGGAAGCAAATGTTGCAAGCACCCCGAAGCCAAGCGCAT GCCGTGCGCAGAGGACTACCTTTCGGTGCTGTTGAACAG CTCTGCGTCCTGCACGAAAAGACCCCGGTGTCAGACCGCG TGACCAAGTGCTGTACCGAAAGCCTCGTGAATCGGCGCCC CTGCTTCTCGGCCCTGGAGGTGGACGAACTTACGTGCCG AAAGAGTTCAACGCGGAAACCTTACCTTTCATGCCGATAT CTGCACCTGTCCGAGAAGGAGCGGCAGATCAAGAAGCAG ACCGCCCTGGTGGAGCTTGTGAAACACAAGCCGAAGGCCA CTAAGGAACAGCTGAAGGCCGTCATGGACGATTTGCTGCC TTCGTCGAGAAGTGCTGCAAGGCCGACGACAAGGAGACTT GCTTCGCTGAAGAAGGGAAGAAGCTTGTGGCCGCTAGCCA GGCTGCACTGGGACTGGGTAGCGGTGGAGGGGGATCAGG GGGTGGTGGATCGGGAGGAGGAGGATCAGGAGGTGGCGG CTCAGGAGGAGGCGGATCAGGCGGTGGAGGATCCGGAGG CGGAGGATCGGGTGGAGGAGGCTCAGATCATTTGCCCTT GGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTT CACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCC ACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCT TCGCAATTCCGGGCCGCGAATATGCACGCCAGATCAAGA CCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCA TGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCA GAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATC TGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
---	---

5

111	HSA(C34S)-GS- (GGGS) ₈ - (Delección 5) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
112	HSA(C34S)-GS- (GGGS) ₈ - (delección 14) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CCQAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQ KTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
113	(Delección 2) HSA(C34S)-GS- (GGGS) ₈ - (delección 4) GDF15	HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT QAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE NDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF KPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS TPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGSDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

10

15

20

114 ADN para la sec. con núm. de ident.: 113 (Delección 2) HSA(C34S)-GS- (GGGS)₈- (delección 4) GDF15	CACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGA AGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTA TCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAA TGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTC AGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTTGGAGA CAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGA AATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATG AATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCC CGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTT TCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAA ATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTT TTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGC CAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGA TGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGA GACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCT TTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCC CAAAGCTGAGTTTGCAGAAAGTTTCAAAGTTAGTGACAGATCT TACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTG AATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGT GAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGT GGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTG CTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTG AGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTATGAATATG CAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGA CTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGC CGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTGATG AATTTAAACCTCTTGTTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAAC AAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTC AGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAA GTGTCAACTCCAACCTTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGG AAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAA GAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAAC CAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAG AGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGAC CATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCA AAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATATAT GCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACT GCACTTGTTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAA AGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTGCGAGCTTTTGT AGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTG CCGAGGAGGGTAAAAAATTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCC TTAGGGCTTGGAAGCGGCGGAGGGGGGAGTGGCGGCGGT GGCTCCGGGGGGGGCGGATCCGGCGGAGGGGGGCAGCGG GGGTGGAGGGAGTGGCGGGGAGGATCAGGGGGAGGAG GATCAGGAGGGGGCGGAAGTGATCATTGCCCTCTCGGGCC CGGACGGTGTTGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTT GAAGACCTTGGATGGGCGGACTGGGTGCTGTCCCAAGAG AGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAG TTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAAACCAGCCT GCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGC GTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGAC CGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAG CCAAAGACTGCCACTGCATA
--	--

115	HSA(C34S)-GA-(GGGGA) ₈ -(delección 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGAGGGGAGGGGA GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLAKDCHCI
-----	--	---

5 10 15 20	116 ADN para la sec. con núm. de ident.: 115 HSA(C34S)-GA- (GGGA)₈- (delección 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTT GGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTG CTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAAAT TAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTG ATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTT TTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAG AGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAAC CTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCAC TGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTA TATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAAT GTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAG CTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAA ACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAA GAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAG ATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGAC AGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTAT ATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAA TGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGC CGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCCTTCAT TAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACT ATGCTGAGGCAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTAT GAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCT GCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGT GCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTA ATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTAC AAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTA CCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAA CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAG CAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTC CTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAG TGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACA GGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATAC GTTCCCAAAGAGTTTAAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCA GATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAA ACAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGG CAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTGCA GCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGAC CTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAATTGTTGCTGCAAGTC AAGCTGCCTTAGGGCTTGGTGCTGGAGGAGGCGGGGCGG GCGGCGGGGGTGCCGGTGGGGGTGGCGCAGGGGGAGGT GGTGCGGGTGGTGGTGGGGCTGGTGGGGGAGGTGCAGGC GGTGCGGGTGCCGGGGGGGGTGGCGCGGATCATTGCCCT CTCGGGCCCCGACGGTGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGG CTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCC CCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCC CAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCAGATAAAAA CCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCC CTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTC AAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGA CTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
--	---	---

117	HSA(C34S)-(AP) ₁₀ - (delección 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCP LGPGRCC RLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TG V SLQTYDDLLAKDCHCI
-----	---	--

118 ADN para la sec. con núm. de ident.: 117 HSA(C34S)-(AP)₁₀- (delección 4) GDF15		GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTT GGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTG CTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAA TTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCT TTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAA CCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACC TGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACC CAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGAT GTGCACTGCTTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAA AATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTTATG CCCCGGAACCTTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCT TTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCT GTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCT TCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAA AATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCG CCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAAGTTT CCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGC TGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGG ACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCC AGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGAAAA ATCCCAGTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCT GCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAA GGATGTTTGCAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCC TGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGAT TACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGA AACCAGTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCAT GAATGCTATGCCAAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGT GGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTT TTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTA GTTGCTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAAC TCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGC AAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGC AGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAAGTTATGTGTGT TGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATG CTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCA GCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAA TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTT CTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAAC TGAAAGCTGTTATGGATGATTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAG TGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGG AGGGTAAAAAATTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGG GCTTGCAACAGCCCCTGCCCTGCACCTGCACCTGCTCCC GCACCGGCTCCAGCCCCAGCTCCGGATCATTGCCCTCTCG GGCCCGGACGGTGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGGCTT CACTTGAAGACCTTGGATGGGCGGACTGGGTGCTGTCCCC AAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCC AGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAA CCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGC CCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCAT TCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGAT GACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
--	--	--

119	HSA(C34S)-(AP) ₁₂ - (delección 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFE CCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGE RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLN QLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG LAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCP LGPGRCCRLHTV RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYD DLLAKDCHCI
-----	---	--

120 ADN para la sec. con núm. de ident.: 119 HSA(C34S)-(AP)₁₂- (delección 4) GDF15		GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATT TGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTT TGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAA AATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTT GCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATA CCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGT GAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAG AACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGA CAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGAT GTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTT GAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACT TTTATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTGCTAAAAGGTATAAA GCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTG CCTGCCTGTTGCCAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAG GGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCA GTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGC AGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTT GCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCC ACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGA TGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAA GATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAAC CTCTGTTGAAAAATCCCAGTGCATTGCCGAAGTGAAAA TGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGAT TTTGTTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACATATGCTGAGG CAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCA AGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGAC TTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGC CGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAGTGTTTCGAT GAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAA TTCCAGAATGCGCTATTAGTTTCGTTACACCAAGAAAGTAC CCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAA CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGAA GCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGG TCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGT AAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTG AACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAA CATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTC CATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAA TCAAGAAACAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGAAACACAA GCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGAT GATTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACG ATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGT TGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGGCTTGCAACGAGCCCC TGCCCCCTGCACCTGCACCTGCTCCCGCACCGGCTCCAGC CCCAGCTCCGGCTCCAGCTCCTGATCATTGCCCTCTCGG GCCCCGACGGTGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGGCTTC ACTTGAAGACCTTGGATGGGCGGACTGGGTGCTGTCCCC AAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCC AGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAA CCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCG CCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTC ATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTAT GATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
---	--	---

121	HSA(C34S)- GGS-(EGKSSGSGSESKST) ₃ -GGS-(delección4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSDHCPLG PGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD GVSLQTYDDLLAKDCHCI
-----	--	--

5 10 15 20	122 ADN para la sec. con núm. de ident.: 121 HSA(C34S)- GGG- (EGKSSGSGSESK ST)3-GGS- (delección 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATT TGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGGTATTGCCTT TGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTA AAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTG TTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCA TACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTT CGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAA CAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAAG ATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGG TTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGAC ATTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATC CTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTTGCTAAAAG GTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGAT AAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGG GATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAG TGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAG CATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAG CTGAGTTTGCAGAAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTAC CAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGA ATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTG TGAAAATCAAGATTGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGC TGTGAAAAACCTCTGTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCG AAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATT AGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGT ATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCT GCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGA GAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGC CAAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTTGGAAGAGCCT CAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGC TTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTA CACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGT TGTAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAA GACTATCTATCCGTGGTCTGTAACCAGTTATGTGTGTTGC ATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCT GTAAGTGAAGCTTGGTCAACAGGCGGCCGTGCTTCAGC GCCCTCGAGGTGGATGAGACTTATGTCCCAAAGGAGTTT AATGCGGAAACTTTTACTTTCCACGCAGACATTTGCACCT TGTCTGAAAAGGAAAGACAGATTAAGAAACAGACTGCTCT TGTGGAAGTGGTAAACATAAACCAAAAGCTACGAAGGA GCAGCTTAAGGCTGTTATGGATGATTTGCGCGCGTTTGT CGAGAAGTGCTGCAAGCGGACGATAAGGAAAACCTTGCTT TGCAGAGGAAGGTAAGAACTCGTAGCGGCAAGTCAGG CTGCGCTTGGCCTTGGAGGCAGTGAAGGCAAATCCTCTG GGAGTGGCTCTGAAAGTAAATCCACCGAGGGCAAATCCA GTGGATCTGGGTCTGAATCTAAGTCTACCGAGGGGAAGT CTTCTGGCAGTGGGTGAGAACTCTAAATCTACAGGCGGT CTGACCATTGCCCGTTGGGACCAGGACGCTGCTGTGCG CTTCATACAGTGCGAGCGAGTTTGAAGACCTGGGCTGG GCTGACTGGGTGCTTAGCCCTCGGGAGGTCCAGGTCAC AATGTGCATTGGCGCGTGTCCAGTCAATTTAGAGCAGC AAATATGCACGCCCAAATAAAAACCTCCCTGCATAGGCTT AAGCCAGATACTGTCCCGCACCATGCTGTGTGCCTGCT TCTTACAATCCTATGGTACTCATCCAGAAGACCGACACGG
--	--	---

		GAGTTAGCCTCCAGACTTATGACGACCTCTTGGCTAAAG ATTGCCATTGTATT
123	HSA(C34S)-GS- (PGGGS) ₈ - (delección 4)GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL NEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRH PDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF TFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSPGGG SPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSDH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLI QKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI

5

10

124 ADN para la sec. con núm. de ident.: 123 HSA(C34S)-GS- (PGGS)₈- (delección 4)GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTT GGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTG CTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAAAT TAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTG ATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTT TTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAG AGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAAC CTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCAC TGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTA TATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAAT GTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAG CTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAA ACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAA GAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAG ATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGAC AGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTAT ATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAA TGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGC CGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCCTTCAT TAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACT ATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTAT GAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCT GCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGT GCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTA ATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTAC AAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTA CCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAA CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAG CAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTC CTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAG TGACAGAGTCACGAAATGTTGCACAGAGTCACTGGTCAACA GGAGACCTTGCTTCTCCGCTCTTGAGGTTGACGAAACGTAT GTCCCAAAAGAGTTCAACGCCGAAACGTTTACGTTTCATGC GGACATATGCACTCTCAGTGAGAAGGAGCGACAAATCAAAA AACAGACTGCTCTTGTAGAGTTGGTAAAACACAAACCTAAAG CAACAAAAGAGCAATTGAAAGCTGTGATGGACGATTTTGCA GCTTTCGTAGAAAAGTGCTGCAAGGCCGACGATAAAGAAAC CTGTTTCGCTGAAGAAGGCAAAAACTTGTGCGGCATCTC AGGCCGCTCTTGGACTTGGGAGCCCGGGTGCCGGGTCTCC AGGCGGAGGCTCTCCGGGCGGAGGTAGTCCCGGAGGGGG TAGTCCGGGCGGCGGTTCTCCAGGTGGAGGTTCTCCTGGT GGTGGCAGTCCTGGCGGAGGATCTGATCACTGTCCCCTTG GGCCCGGAGGTTGCTGCCGACTTCATACAGTTCCGCCAG CCTTGAAGATTTGGGGTGGGCCGACTGGGTGTTGAGCCCG AGAGAGGTCCAAGTCACGATGTGTATTGGAGCCTGTCCCTC TCAATTCGAGCCGCAAATATGCATGCGCAAATAAAGACGA GTCTCCATCGGTTGAAGCCTGATACTGTCCCAGCTCCGTGC TGCGTCCCCGCGAGTTATAATCCCATGGTCCTTATACAGAA AACAGACACTGGTGTGACGCTTCAGACGTATGACGATTTGC TTGCTAAAGACTGTCATTGTATT
---	---

125	HSA(C34S)-GS-(AGGGS) ₈ -(delección 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSAGGGSAGGGS AGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGS CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSL QTYDDLLAKDCHCI
-----	--	--

5 10 15 20	126 ADN para la sec. con núm. de ident.: 125	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTT GGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTG CTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAT TAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTG ATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTT TTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAG AGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAAC CTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCAC TGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTA TATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAAT GTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAG CTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAA ACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAA GAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAG ATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGAC AGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTAT ATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAA TGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGC CGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCCTTCAT TAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACT ATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTAT GAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCT GCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGT GCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTA ATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTAC AAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTA CCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAA CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAG CAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTC CTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAG TGACAGAGTCACTAAATGTTGTACCGAGTCTCTTGTTAATAG GCGGCCATGCTTCAGTGCATTGGAAGTCGACGAAACCTATG TACCAAAGGAGTTCAACGCAGAAACATTTACATTCCATGCTG ATATCTGCACATTGAGCGAGAAAGAGAGACAGATTAAGAAA CAGACAGCGCTTGTTGAACTGGTTAAACACAAACCAAAGC TACCAAGGAGCAGCTTAAGGCAGTAATGGATGACTTCGCGG CCTTTGTGAGAAATGTTGTAAAGCGGATGATAAAGAGACA TGCTTCGCCGAAGAGGGCAAAAAACTTGTAGCGGCAAGCC AGGCCGCACTGGGTCTCGGTAGTGCGGGCGGTGGTTCAGC GGGGGGAGGATCTGCAGGTGGTGGCTCAGCGGGTGGCGG TAGCGCTGGGGGGGGCTCCGCAGGTGGGGGATCAGCAGG CGGCGGATCAGCCGGCGGTGGATCCGACCACTGTCTCTC GGGCTGGTGGTGTGTTGCCGCCTCCATACTGTGCGCGCGT CTCTTGAGGATCTGGGGTGGGCTGATTGGGTTCTCTCTCCC CGCGAAGTGCAAGTGACCATGTGTATTGGTGCTTGCCCAAG TCAATTCGAGCAGCTAACATGCACGCCCAGATCAAGACTA GCCTGCATCGGCTTAAGCCCGACACTGTTCTGCCCCTTGC TGTGTTCTGCATCTTATAATCCAATGGTCCTGATCCAGAAA ACCGATACGGGTGTATCATTGCAACATACGACGACTTGCT TGCCAAAGATTGCCATTGCATT
--	--	---

127	HSA(C34S)- GGS-(EGKSSGSGSESK ST) ₂ -GGS-(delección4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA FTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECC HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSH CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGLGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQ VTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPA SYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
-----	---	--

5 10 15 20	128 ADN para la sec. con núm. de ident.: 127	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTT GGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTG CTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAGATCATGTAAAT TAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTG ATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCTTT TTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAG AGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAAC CTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCAC TGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTA TATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAAT GTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAG CTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAA ACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAA GAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAG ATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGAC AGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTAT ATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAA TGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGC CGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCCTTCAT TAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC ATGCTGAGGCAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTGTAT GAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCT GCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGT GCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTA ATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTAC AAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTA CCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAA CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAG CAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTC CTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAG TGACAGAGTCACGAAATGCTGTACAGAATCCCTCGTGAATA GAAGGCCCTGCTTCTCTGCCCTTGAGGTGGACGAGACTTAC GTCCCTAAGGAGTTTAAACGCCGAGACCTTTACTTTTCATGCT GATATTTGCACCCTTTCCGAAAAGGAGCGGCAGATCAAGAA ACAAACAGCCTTGGTGGAACCTCGTAAACATAAACCCAAAG CCACCAAGGAACAACCTAAAGCTGTTATGGATGACTTCGCA GCCTTCGTCGAGAAATGTTGCAAGGCGGATGATAAGGAAAC GTGTTTTGCTGAGGAAGGGAAGAAAGTTGGTTGCTGCCTCTC AAGCGGCTCTGGGGCTTGGCGGATCAGAGGGGAAGTCCTC CGGGTCCGGTAGCGAGTCCAAATCTACGGAAGGGAAGTCA TCCGGTTCTGGGTGAGAGTCCAAATCCACAGGAGGATCAGA CCATTGCCCATTTGGGACCAGGACGATGTTGTCGCCTGCATA CGGTAAGAGCGTCTCTGGAGGATCTCGGCTGGGCGGATTG GGTTCTCTACCCACGAGAAGTACAGGTCACAATGTGCATAG GAGCTTGTCCGAGCCAATTCCGGGCGGCTAATATGCACGC ACAGATCAAGACCTCTTTGCACCGCTTGAAGCCCGATACCG TGCCAGCACCGTGTTGCGTCCCAGCATCTTACAACCCTATG GTTTTGATACAGAAAACCTGACACAGGTGTGAGCCTCCAGAC ATATGATGATTTGCTGGCTAAGGATTGCCACTGTATA
--	--	---