

PROTEÍNAS DE FUSIÓN DEL FACTOR DE DIFERENCIACIÓN DE CRECIMIENTO 15**SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 62/655,108, presentada el 9 de abril de 2018, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. El Listado de Secuencias se proporciona como un archivo titulado A-2239-WO-PCT_SeqList_ST25.txt, creado el 15 de marzo de 2019, que tiene 109 kb de tamaño. La información en el formato electrónico del listado de secuencias se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación se refiere a molécula de Fcs de GDF15 tales como proteínas de fusión de GDF15, composiciones de las mismas, y métodos para la preparación y el uso de tales proteínas.

ANTECEDENTES

El factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15), también citado como citocina 1 inhibidora del macrófago (MIC1) (Bootcov MR, 1997, *Proc Natl Acad Sci* 94:11514-9), factor morfogénico del hueso placentario (PLAB) (Hromas R 1997, *Biochim Biophys Acta*. 1354:40-4), factor beta de crecimiento transformante placentario (PTGFB) (Lawton LN 1997, *Gene*. 203:17-26), factor derivado de la próstata (PDF) (Paralkar VM 1998, *J Biol Chem*. 273:13760-7), y gen activado por fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NAG-1) (Baek SJ 2001, *J Biol Chem*. 276: 33384-92), es una proteína secretada que circula en el plasma como un homodímero de ~25 kDa. El GDF15 se une a la familia de receptores GDNF de tipo α (GFRAL) con alta afinidad. Se cree que la señalización celular inducida por GDF15 requiere la interacción de GFRAL con el correceptor RET.

Se ha relacionado el GDF15 con múltiples actividades biológicas. Se ha demostrado que un elevado GDF15 se correlaciona con la pérdida de peso y la administración de GDF15 ha demostrado reducir la ingesta de alimento y el peso corporal. Por consiguiente, hay una necesidad por molécula de Fc de Fcs eficaces de GDF15 que se puedan administrar como un agente terapéutico. La presente divulgación proporciona molécula de Fc de Fcs de GDF15 que satisfacen esta necesidad y proporcionan ventajas asociadas.

SUMARIO

En el presente documento se proporcionan molécula de Fc de Fcs de GDF15, métodos de preparación de las molécula de Fc de Fcs y métodos de uso de las moléculas. En algunas realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 es una proteína de fusión GDF15-Fc. La proteína de fusión puede comprender una región de GDF15 unida a una región de Fc. En

algunas realizaciones, la región de GDF15 se une al Fc a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y al menos una mutación, tal como una mutación de la asparagina en la posición 3 (N3), como una mutación del aspartato en la posición 5 (D5), o mutaciones de la asparagina en la posición 3 y del aspartato en la posición 5. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende una mutación del aspartato en la posición 5 a glutamato (D5E). En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende una mutación de la asparagina en la posición 3 a glutamina (N3Q), por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones más, la región de GDF15 comprende ambas mutaciones, N3Q y D5E. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene un enlazador que es un enlazador G4S (SEQ ID NO: 19) o G4Q (SEQ ID NO: 24), tal como un enlazador (G4S)_n o (G4Q)_n, en donde n es mayor de 0. En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene un enlazador que es un enlazador G4A (SEQ ID NO: 58), tal como un enlazador (G4A)_n, en donde n es mayor de 0. En algunas realizaciones, n es 1 o 2. En algunas realizaciones, n es mayor de 2, tal como 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 58.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene una región de Fc que comprende una mutación de par con carga. En algunas realizaciones, la región de Fc tiene una región de bisagra truncada. En algunas realizaciones, la región de Fc se selecciona de la Tabla 3.

También se proporcionan en el presente documento dímeros y tetrámeros que comprenden proteínas de fusión divulgadas en el presente documento. En una realización, el dímero comprende una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-57. En algunas realizaciones, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57 dimeriza con un dominio Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36 o 37, tal como se muestra en la Tabla 6. En algunas realizaciones, los dímeros forman tetrámeros. También se proporcionan los métodos de producción y de uso de las moléculas de Fcs de GDF15 divulgadas en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** es un gráfico que muestra el efecto sobre el peso corporal de los monos cinomolgos dosificados con vehículo, 3 mg/kg del control positivo FGF21-Fc, 1.5 mg/kg de scFc-GDF15 o 1.5 mg/kg del dímero Fc Δ 10(-)-(G4S)₄-GDF15:Fc Δ 10(+),K semanalmente

durante seis semanas, seguido por un período de reposo farmacológico de cinco semanas.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra el efecto sobre los niveles de triglicéridos de los monos cinomolgos dosificados con vehículo, 3 mg/kg del control positivo FGF21-Fc, 1.5 mg/kg de scFc-GDF15 o 1.5 mg/kg del dímero FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15:FcΔ10(+,K) semanalmente durante seis semanas, seguido por un período de reposo farmacológico de cinco semanas.

La **Figura 3** muestra el perfil de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 después del intercambio catiónico.

La **Figura 4** es un mapa de péptidos de FcΔ10(+)-(G4)-GDF15.

La **Figura 5** es un gráfico que muestra el efecto sobre la ingesta de alimento en ratones en función de la dosis de los dímeros FcΔ10(-)-GDF15(Δ3):FcΔ10(+,K) (SEQ ID NO: 41 y 32); FcΔ10(-)-GDF15(N3D):FcΔ10(+,K) (SEQ ID NO: 42 y 32); FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3):FcΔ10(+,K,CC) (SEQ ID NO: 43 y 34); FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D):FcΔ10(+,K,CC) (SEQ ID NO: 44 y 34)) y FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15:FcΔ10(+,K) (SEQ ID NO: 39 y 32).

La **Figura 6** es un gráfico de la concentración sérica de FcΔ10(-)-GDF15(Δ3) (SEQ ID NO: 41); FcΔ10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3) (SEQ ID NO: 43); y FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44)) en función del tiempo en ratones.

La **Figura 7** es un gráfico que muestra el efecto sobre el peso corporal de monos cinomolgos dosificados con vehículo, 3 mg/kg del control positivo FGF21-Fc, 0.5 mg/kg o 3.0 mg/kg de FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E):FcΔ16(+,K,CC) (SEQ ID NO: 45 y 35), 0.5 mg/kg o 3.0 mg/kg de FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K,CC) (SEQ ID NO: 46 y 35) o 0.5 mg/kg o 3.0 mg/kg de FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 47 y 36) semanalmente durante cuatro semanas, seguido de un período de reposo farmacológico de cuatro semanas.

La **Figura 8** es un gráfico que muestra el efecto sobre el peso corporal de monos cinomolgos dosificados con vehículo, 1.5 mg/kg de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15:FcΔ10(+,K) (SEQ ID NO: 39 y 32), 1.5 mg/kg de FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q):FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 49 y 36); 1.5 mg/kg de FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 50 y 36), 1.5 mg/kg de FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 54 y 36) o 1.5 mg/kg de FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ10(+,K,L234A/L235A) (SEQ ID NO: 57 y 37) semanalmente durante dos semanas.

La **Figura 9** es un gráfico de la ingesta de alimento en función de la dosis en ratones ob/ob a los que se les administra FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 50 y 36).

La **Figura 10** es un gráfico de la ingesta de alimento en función de la dosis en ratones ob/ob a los que se les administra FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ10(+,K,L234A/L235A) (SEQ ID NO: 57 y 37).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se proporcionan moléculas de GDF15, métodos de preparación de las moléculas y métodos de uso de las moléculas. En algunas realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 es una proteína de fusión GDF15-Fc. La proteína de fusión puede comprender una región de GDF15 unida a una región de Fc. En algunas realizaciones, la región de GDF15 se une al Fc a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende un GDF15 de tipo silvestre. Tanto el GDF15 humano como el de murino tienen un péptido señal y un prodominio. La secuencia de nucleótidos para el GDF15 humano de longitud completa es:

```

atgccggggc aagaactcag gacggtgaat ggctctcaga tgctcctggt gttgctggtg ctctcgtggc tgccgcatgg
gggcgccctg tctctggccg aggcgagccg cgcaagtttc ccgggaccct cagagttgca ctccaagac tccagattcc
gagagttgcg gaaacgctac gaggacctgc taaccaggct gcgggccaac cagagctggg aagattcgaa
caccgacctc gtccgggccc ctgcagtccg gatactcacg ccagaagtgc ggctgggacg cggcgccac ctgcacctgc
gtatctctcg ggccgcccct cccgaggggc tccccgaggc ctccgcctt caccgggctc tgtccggct gtccccgacg
gcgtaagggt cgtgggacgt gacacgaccg ctgcggcgtc agtcagcct tgcaagacc caggcgcccg cgctgcacct
gcgactgtcg ccgcccgcgt cgcagtcgga ccaactgtg gcagaatctt cgtccgcacg gcccagctg
gagttgact tgcgccgca agccgccagg gggcgccgca gagcgctgc gcgcaacggg gacctgtc
cgctggggc cggcgctgc tgccgtctgc acacggtccg cgctcgctg gaagacctg gctgggcca ttgggtgctg
tcgccacggg aggtgcaagt gacctgtgc atcggcgcgt gcccgagcca gttccgggcg gaaacatgc
acgcgcagat caagacgagc ctgcaccgcc tgaagcccga caggtgcca gcgccctgt gcgtgcccgc
cagctacaat ccatggtgc tcattcaaaa gaccgacacc ggggtgtcgc tccagaccta tgatgactg ttagccaaag
actgccactg catatga (SEQ ID NO: 1)

```

La secuencia de aminoácidos para el GDF15 humano de longitud completa (308 aminoácidos) es:

```

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLP HGGALSLAEASRASFP GPSELHSEDSRFREL RKRYED
LLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISR AALPEGLPEASRLHRALFR
LSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESS SARPQLELHLRPQA
ARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQF
RAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLAKDCHCI
(SEQ ID NO: 2)

```

La secuencia de nucleótidos para el GDF15 humano sin su secuencia señal es:

```

ctgtctctgg ccgaggcgag ccgcgcaagt ttccggggac cctcagagtt gcactccgaa gactccagat tccgagagtt
gcggaacgc tacgaggacc tgctaaccag gctgcgggcc aaccagagct gggaagattc gaacaccgac
ctcgtcccg cccctgcagt ccgatactc acgcagaag tgcggctggg atccggcggc cacctgcacc
tgcgatatc tcgggcccgc ctccccgagg ggctccccga ggctccccgc cttaccggg ctctgttccg gctgtccccg
acggcgtaaa ggtcgtggga cgtgacacga ccgctcgggc gtcagctcag ccttgcaaga cccaggcgcg

```

ccgcgctgca cctgcgactg tcgccgccgc cgtgcagtc ggaccaactg ctggcagaat ctctgcccgc acggccccag
 ctggagttgc acttcgggcc gcaagccgcc agggggcgcc gcagagcgcg tgcgcgcaac ggggaccact
 gtccgctcgg gcccgggcgt tctgcccgc tgcacacggt ccgcgcgctg ctggaagacc tgggctgggc cgattgggtg
 ctgtgccac gggaggtgca agtgaccatg tgcacggcg cgtgcccag ccagttccgg gcggcaaaca tgcacgcgca
 5 gatcaagacg agcctgcacc gcctgaagcc cgacacggtg ccagcgccct gctgcgtgcc cgccagctac
 aatcccatgg tgctcattca aaagaccgac accgggggtg cgctccagac ctatgatgac ttgttagcca aagactgcca
 ctgcatatga (SEQ ID NO: 3)

La secuencia de aminoácidos para el GDF15 humano sin su secuencia señal de aminoácidos 29 (279 aminoácidos) es:

10 LSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELKRKYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPE
 VRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPAL
 HLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLEHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTV
 RASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPAS
 YNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 4)

15 La secuencia de nucleótidos para el GDF15 humano sin su péptido señal o prodominio es:

gcgcgcaacggggaccactgtccgctcggggccggcggtgctgccgtctgcacacggtccgcgcgctgctggaagacctgggct
 gggccgattgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcgccgcgctgcccagccagttccggcgccgcaaacat
 gcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaac
 20 ccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcatatga
 (SEQ ID NO: 5)

La secuencia de aminoácidos para el GDF15 humano sin su péptido señal o prodominio (el dominio activo de GDF15 de 112 aminoácidos) es:

25 ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQI
 KTSLSHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 6)

La secuencia de nucleótidos para el GDF15 de murino de longitud completa es:

atggccccgc ccgcgctcca ggcccagcct ccaggcggt ctcaactgag gttcctgctg ttctgctgc tgtgtgctgt
 gctgctgtca tggccatcgc agggggacgc cctggcaatg cctgaacagc gacctccgg ccctgagtcc caactcaacg
 ccgacgagct acggggctgc ttccaggacc tgctgagccg gctgcatgcc aaccagagcc gagaggactc
 30 gaactcagaa ccaagtctg acccagctgt ccggatactc agtccagagg tgagattggg gtcccacggc cagctgctac
 tccgcgtcaa ccgggcgctg ctgagtcagg gtctccccga agcctaccgc gtgcaccgag cgctgctcct
 gctgacgccg acggccccgc cctgggacat cactaggccc ctgaagcgtg cgctcagcct ccggggaccc cgtgctccg
 cattacgcct gcgctgacg ccgctccgg acctggctat gctgccctct ggccggcacgc agctggaact gcgcttacgg
 gtagccgccg gcagggggcg ccgaagcgcg catgcgacc caagagactc gtgccactg ggtccggggc
 35 gctgctgtca cttggagact gtcaggcaa ctctgaaga cttgggctgg agcgactggg tgctgtcccc gcgccagctg
 cagctgagca tgtgcgtggg cgagtgtccc cacctgtatc gctccgcgaa cagcatgcg cagatcaaag

cacgcctgca tggcctgcag cctgacaagg tgcctgcccc gtgctgtgtc cctccagct acaccccggt ggttcttatg
cacaggacag acagtgtgt gtcactgcag acttatgatg acctggtggc cgggggctgc cactgcgctt ga (SEQ
ID NO: 7)

La secuencia de aminoácidos para el GDF15 de murino de longitud completa (303
aminoácidos) es:

MAPPALQAQPPGGSQRLRFLFLLLLLLLLLSWPSQGDALAMPEQRPSGPESQLNADELGRFQ
DLLSRLHANQSREDSNSEPSPDPAVRILSPEVRLGSHGQLLRVNRASLSQGLPEAYRVHRAL
LLLTPTARPWDITRPLKRALSLRGPRAPALRLRLTPPPDLAMLPSGGTQLELRVAAGRGRR
SAHAHPRDSCPLGPGRCCHLETQATLEDLGWSDWVLSRQLQLSMCVGECPLYRSANT
HAQIKARLHGLQPKVPAPCCVPSSYTPVLMHRTDSGVSLQTYDDLVARACHCA (SEQ ID
NO: 8)

La secuencia de nucleótidos para el GDF15 de murino sin su secuencia señal es:

tcgcagggggacgcccctggcaatgcctgaacagcgaccctccggccctgagtcaccaactcaacgacgagctacggggctg
ctccaggacctgctgagccgctgcatgccaccagagccgagaggactcgaactcagaaccaagtcctgaccagctgtccg
gatactcagtcagaggtgagattgggggtccacggccagctgctactccgcgtcaaccgggctgctgagtcagggtctccccg
aagcctaccgctgcaccgagcgctgctcctgctgacgcccagggcccccctgggacatcactaggccctgaagcgtgctgct
cagcctccggggaccccgctgctccgcattacgcctgctgacgcccgcctccggacctggctatgctcccttggcgccacgc
agctggaactgcgcttacgggtagccgcccgcagggggcgccgaagcgcgcatgcgcaccaagagactcgtgcccactgggt
ccggggcgctgctgctcacttgagactgtgcaggcaactctgaagactgggctggagcgactgggtgctgtcccgccagctg
cagctgagcatgtgctgggagtggtccccacctgtatcgctccgcgaacacgcagatgcgcagatcaaagcacgcctgcatggcct
gcagcctgacaagggtgctgccccgtgctgtgtccccctccagctacaccccggtggttcttatgcacaggacagacagtgggtgtca
ctgcagacttatgatgacctggtggccgggggctgccactgcgcttga (SEQ ID NO: 9)

La secuencia de aminoácidos para el GDF15 de murino sin su secuencia señal de
aminoácidos 32 (271 aminoácidos) es:

SQGDALAMPEQRPSGPESQLNADELGRFQDLLSRLHANQSREDSNSEPSPDPAVRILSPEV
RLGSHGQLLRVNRASLSQGLPEAYRVHRALLLTPTARPWDITRPLKRALSLRGPRAPALRL
RLTPPPDLAMLPSGGTQLELRVAAGRGRRSAHAHPRDSCPLGPGRCCHLETQATLEDL
GWSDWVLSRQLQLSMCVGECPLYRSANTHAQIKARLHGLQPKVPAPCCVPSSYTPVVL
MHRTDSGVSLQTYDDLVARACHCA (SEQ ID NO: 10)

La secuencia de nucleótidos para el GDF15 de murino sin su secuencia señal o
prodominio es:

agcgcgcatgcgcaccaagagactcgtgcccactgggtccggggcgctgctgtcacttgagactgtgcaggcaactctgaag
actgggctggagcgactgggtgctgtccccgcgcagctgcagctgagcatgtgctgggagtggtccccacctgtatcgctccg
cgaacacgcagatgcgcagatcaaagcacgcctgcatggcctgcagcctgacaagggtgctgccccgtgctgtgtccccctccagctac
accccggtggttcttatgcacaggacagacagtgggtgtgctactgcagacttatgatgacctggtggccgggggctgccactgcgctt
ga (SEQ ID NO: 11)

La secuencia de aminoácidos para el GDF15 de murino sin su péptido señal o prodominio (dominio activo de 115 aminoácidos) es:

SAHAHPRDSCPLGPGRCCHLETVQATLEDLGWSDWVLSRQLQLSMCVGECPLYRSANT
HAQIKARLHGLQPDKVPAPCCVPSSYTPVVLHRTDSGVSLQTYDDLVARACHCA (SEQ ID
NO: 12)

En algunas realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 comprende una región de GDF15 que comprende un dominio activo de GDF15, por ejemplo, GDF15 sin su péptido señal o prodominio. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o 12. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende una secuencia de GDF15 con una o más mutaciones, tales como al menos una mutación en el dominio activo del GDF15. En realizaciones particulares, la mutación o mutaciones no reducen o eliminan la actividad de GDF15. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende una mutación en el dominio activo del GDF15 humano. En una realización, la mutación es una delección de los tres primeros aminoácidos del dominio activo, tal como "GDF15(Δ 3)" que es un dominio activo del GDF15 humano en el que los tres primeros aminoácidos están eliminados (es decir, la SEQ ID NO: 13).

En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende una mutación de la asparagina en la posición 3 (N3) del dominio activo del GDF15 humano (SEQ ID NO: 6). Una mutación de N3 se puede referir a la mutación del resto de asparagina en la posición 3 de la SEQ ID NO: 6 o la mutación de un resto de asparagina que se corresponde con la asparagina en la posición 3 de la SEQ ID NO: 6 en una secuencia de aminoácidos de GDF15. En algunas realizaciones, la asparagina en la posición 3 está mutada a glutamina (N3Q) o aspartato (N3D). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 comprende una región de GDF15 de GDF15(N3Q) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 comprende una región de GDF15 de GDF15(N3D) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la región de GDF15 comprende una mutación del aspartato en la posición 5 (D5) del dominio activo del GDF15 humano (SEQ ID NO: 6). Una mutación D5 se puede referir a la mutación del resto de aspartato en la posición 5 de la SEQ ID NO: 6 o la mutación de un resto de aspartato que se corresponde con el aspartato en la posición 5 de la SEQ ID NO: 6 en una secuencia de aminoácidos de GDF15. En una realización, el aspartato en la posición 5 se muta a glutamato (D5E). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 comprende una región de GDF15 de GDF15(D5E) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

En otras realizaciones más, la región de GDF15 comprende una combinación de mutaciones, tales como una combinación de mutaciones Δ 3 y D5, por ejemplo,

GDF15(Δ 3/D5E) (SEQ ID NO: 17) o una combinación de mutaciones de N3 y D5, por ejemplo, GDF15(N3D/D5E) o GDF15(N3Q/D5E). Dentro, la región de GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

La Tabla 1 proporciona ejemplos de regiones de GDF15 que se pueden usar en las moléculas de GDF15.

Tabla 1 – Regiones de GDF15

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
6	GDF15	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC HCI
13	GDF15(Δ 3)	GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP CCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI <i>Los tres primeros aminoácidos en el extremo N-terminal de la secuencia de GDF15 (SEQ ID NO: 6) están deletados en esta región de GDF15.</i>
14	GDF15(N3Q)	<u>ARQ</u> GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC HCI <i>El resto subrayado y en negrita es la mutación N3Q.</i>
15	GDF15(N3D)	<u>ARD</u> GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC HCI <i>El resto subrayado y en negrita es la mutación N3D.</i>
16	GDF15(D5E)	ARNG <u>E</u> HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP CCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCH CI <i>El resto subrayado y en negrita es la mutación D5E.</i>
17	GDF15(Δ 3/D5E)	<u>GE</u> HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP

5		CCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI <i>Los tres primeros aminoácidos en el extremo N-terminal de la secuencia de GDF15 (SEQ ID NO: 6) están deletados en esta región de GDF15; el resto subrayado y en negrita es la mutación D5E (posición en referencia a la secuencia de GDF15 de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 6).</i>
10	18 GDF15(N3Q/D5E)	AR QGE HCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDC HCI <i>Los restos subrayados y en negrita son mutaciones de N3Q y D5E.</i>

En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 está fusionada directamente a un Fc.

En otras realizaciones, el Fc está fusionado a la molécula de Fc de GDF15 a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador G4S (SEQ ID NO: 19). En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador G4Q (SEQ ID NO: 24). En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador G4A (SEQ ID NO: 58). El enlazador puede ser un enlazador (G4S)_n o (G4Q)_n, en donde n es mayor de 0. El enlazador puede ser un enlazador (G4A)_n, en donde n es mayor de 0. En algunas realizaciones, n es 1 o 2. En algunas realizaciones, n es mayor de o igual a 2, tal como 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 58 tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 – Enlazadores

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
19	G4S	GGGGS
20	(G4S) ₂	GGGSGGGGS
21	(G4S) ₄	GGGSGGGSGGGSGGGGS
22	(G4S) ₈	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GSGGGGS
23	G4	GGGG
24	G4Q	GGGGQ
25	(G4Q) ₄	GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ
58	G4A	GGGGA

En algunas realizaciones, la molécula de Fc de GDF15 comprende una región de Fc.

La región de Fc puede comprender o derivar del dominio Fc de una cadena pesada de un

anticuerpo. En algunas realizaciones, la región de Fc puede comprender un dominio Fc con una mutación, tal como una mutación de par con carga, una mutación en un sitio de glucosilación o la inclusión de un aminoácido no natural. La región de Fc puede derivar de un dominio constante de IgG humana de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, la región de Fc comprende el dominio constante de una cadena pesada de IgA, IgD, IgE e IgM.

En algunas realizaciones, la región de Fc comprende un dominio Fc con una mutación de par con carga. Mediante la introducción de una mutación que da como resultado una región de Fc cargada, la molécula de Fc de GDF15 puede dimerizar con una molécula de Fc correspondiente que tiene la carga opuesta. Por ejemplo, una mutación de aspartato a lisina (E356K, en donde 356 es la posición usando la numeración EU, y se corresponde con las posiciones tal como se indica en las Tablas 3-5) y una mutación de glutamato a lisina (D399K en donde 399 es la posición usando la numeración EU, y se corresponde con las posiciones tal como se indica en las Tablas 3-5) se puede introducir en la región de Fc que está unida a una región de GDF15, opcionalmente a través de un enlazador, lo que da como resultado una región de Fc cargada positivamente para la molécula de Fc de GDF15. Las mutaciones de lisina a aspartato (K392D, K409D; en donde 392 y 409 son las posiciones usando la numeración EU y se corresponde con las posiciones tal como se indica en las Tablas 3-5) se pueden introducir en un dominio Fc de una molécula de Fc separada, lo que da como resultado una molécula de Fc de Fc cargada negativamente. Los restos de aspartato en la molécula de Fc cargada negativamente se pueden asociar con los restos de lisina de la región de Fc cargada positivamente de la molécula de Fc GDF15 a través de una fuerza electrostática, lo que facilita la formación de heterodímeros de Fc entre la región de Fc de la molécula de Fc de GDF15 y la molécula de Fc, a la vez que se reduce o se evita la formación de homodímeros de Fc entre las regiones de Fc de las moléculas de GDF15 o entre moléculas de Fc.

En algunas realizaciones, una o más mutaciones de lisina a aspartato (K392D, K409D) se introducen en la región de Fc que está unida a una región de GDF15, opcionalmente a través de un enlazador y una mutación de aspartato a lisina (E356K) y una mutación de glutamato a lisina (D399K) se introducen en el dominio Fc de otra molécula. Los restos de aspartato en la región de Fc de la molécula de GDF15 se pueden asociar con los restos de lisina de la molécula de Fc a través de la fuerza electrostática, facilitando la formación de heterodímeros de Fc entre la región de Fc de la molécula de GDF15 y la molécula de Fc, y reduciendo o evitando la formación de homodímeros de Fc entre las regiones de Fc de las moléculas de GDF15 o entre moléculas de Fc.

En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende una región de Fc que comprende un dominio Fc con una región de bisagra mutada. En algunas realizaciones, el

dominio Fc comprende una delección en la bisagra. En algunas realizaciones, están delecionados diez aminoácidos de la bisagra, por ejemplo, Fc Δ 10. En otras realizaciones, están delecionados dieciséis aminoácidos de la bisagra, por ejemplo, Fc Δ 16. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una delección de bisagra (por ejemplo, Fc Δ 10 o Fc Δ 16) y una mutación de par con carga, de manera que el dominio Fc esté cargado positivamente o negativamente. Por ejemplo, el dominio Fc puede comprender una delección de diez aminoácidos en la bisagra y mutaciones de lisina a aspartato (K392D, K409D), tal como Fc Δ 10(-). En otra realización, el dominio Fc puede comprender una delección de diez aminoácidos en la bisagra y una mutación de aspartato a lisina (E356K) y una mutación de glutamato a lisina (D399K) tal como una Fc Δ 10(+). En otra realización, el dominio Fc puede comprender una delección de dieciséis aminoácidos en la bisagra y mutaciones de lisina a aspartato (K392D, K409D), tales como Fc Δ 16(-). En otra realización, el dominio Fc puede comprender una delección de dieciséis aminoácidos en la bisagra y una mutación de aspartato a lisina (E356K) y una mutación de glutamato a lisina (D399K), tal como una Fc Δ 16(+).

En algunas realizaciones, una molécula de Fc que comprende una delección de bisagra y una mutación de par con carga heterodimeriza con dicha molécula de GDF15. Por ejemplo, la molécula de Fc puede tener una delección de bisagra y una mutación de par con carga que complementa la delección de bisagra y la mutación de par con carga de la región de Fc de una molécula de GDF15. Por ejemplo, una molécula de Fc puede comprender un dominio Fc con una delección de diez aminoácidos en la bisagra y mutaciones de lisina a aspartato (K392D, K409D) tales como Fc Δ 10(-), que puede comprender opcionalmente una lisina en C-terminal (por ejemplo, Fc Δ 10(-, K)). La molécula de Fc puede heterodimerizar con una molécula de GDF15 que comprende una Fc Δ 10(+). En otra realización, la molécula de Fc puede comprender una delección de diez aminoácidos en la bisagra y una mutación de aspartato a lisina (E356K) y una mutación de glutamato a lisina (D399K) tal como una Fc Δ 10(+), que puede comprender opcionalmente una lisina en C-terminal (por ejemplo, Fc Δ 10(+, K)). La molécula de Fc puede heterodimerizar con una molécula de GDF15 que comprende una Fc Δ 10(-). En otra realización, la molécula de Fc puede comprender una delección de dieciséis aminoácidos en la bisagra y mutaciones de lisina a aspartato (K392D, K409D), tal como Fc Δ 16(-), que opcionalmente puede comprender una lisina en C-terminal (por ejemplo, Fc Δ 16(-, K)). La molécula de Fc que puede heterodimerizar con una molécula de GDF15 que comprende una Fc Δ 16(+). En otra realización, la molécula de Fc puede comprender una delección de dieciséis aminoácidos en la bisagra y una mutación de aspartato a lisina (E356K) y una mutación de glutamato a lisina (D399K) tal como una Fc Δ 16(+), que puede comprender opcionalmente una lisina en C-terminal (por ejemplo, Fc Δ 16(-, K)). La molécula de Fc puede heterodimerizar con una molécula de GDF15 que comprende una Fc Δ 16(-).

En algunas realizaciones, la región de Fc o la molécula de Fc comprende un dominio Fc con una mutación L234A y/o L235A, en donde 234 y 235 son las posiciones usando la numeración EU y se corresponde con las posiciones tal como se indican en las Tablas 3-5. El dominio Fc puede comprender una mutación L234A, una mutación L235A, una mutación de par con carga, una delección de bisagra, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende tanto una mutación L234A como una mutación L235A. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una delección de bisagra, una mutación L234A, una mutación L235A, y una mutación de par con carga, tal como FcΔ10(+, L234A/L235A), FcΔ10(-, L234A/L235A), FcΔ16(+, L234A/L235A) o FcΔ16(-, L234A/L235A). En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una lisina opcional en C-terminal, por ejemplo, FcΔ10(+,K,L234A/L235A), FcΔ10(-,K,L234A/L235A), FcΔ16(+,K,L234A/L235A) o FcΔ16(-,K,L234A/L235A).

En algunas realizaciones, la región de Fc o la molécula de Fc comprende un dominio Fc con un "pinzamiento de cisteína". Una mutación de pinzamiento de cisteína implica la introducción de una cisteína en el dominio Fc en una localización específica a través de una mutación, de manera que cuando se incuba con otro dominio Fc que también tiene una cisteína introducida en una localización específica a través de la mutación, se puede formar un enlace disulfuro (pinzamiento de cisteína) entre los dos dominios Fc (por ejemplo, entre un dominio FcΔ16 (+) que tiene una mutación de "pinzamiento de cisteína" y un dominio FcΔ16 (-) que tiene una mutación de "pinzamiento de cisteína"). La cisteína se puede introducir en el dominio de CH3 de un dominio Fc. En algunas realizaciones, un dominio Fc puede contener una o más de dichas mutaciones de pinzamiento de cisteína. En una realización, se proporciona un pinzamiento de cisteína introduciendo una mutación de serina a cisteína (S354C, en donde 354 es la posición usando la numeración EU, y se corresponde con la posición tal como se indica en las Tablas 3-5) en un primer dominio Fc y una mutación de tirosina a cisteína (Y349C, en donde 349 es la posición usando la numeración EU, y se corresponde con la posición tal como se indica en las Tablas 3-5) en un segundo dominio Fc. En una realización, una molécula de GDF15 comprende una región de Fc que comprende un dominio Fc con un pinzamiento de cisteína, una mutación de par con carga negativa y una delección de bisagra de dieciséis aminoácidos (por ejemplo, GDF15- FcΔ16(-,CC)), y una molécula Fc que comprende un dominio Fc que comprende un pinzamiento de cisteína, una mutación de par con carga positiva, y una delección de bisagra de dieciséis aminoácidos y una lisina opcional en C-terminal (por ejemplo, FcΔ16(+,K,CC)). El pinzamiento de cisteína puede aumentar la heterodimerización de la molécula GDF-Fc con la molécula de Fc.

Los ejemplos de regiones de Fc que se pueden usar en una molécula de GDF15 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 – Regiones de Fc

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
26	FcΔ10(-)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<u>D</u>TPPVLDS DGSFFLYS<u>D</u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>
27	FcΔ10(+)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR<u>K</u>EMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV<u>L</u><u>K</u>S DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>
28	FcΔ10(-,CC)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV<u>C</u>TLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<u>D</u>TPPVLDS DGSFFLYS<u>D</u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación Y349C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>
29	FcΔ16(-,CC)	GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQV<u>C</u>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG

5		FYP S DI A VEWESNGQPENNY D TT P VLDS D GSFF LYS D LTVDKSRWQQGNVFSCSV M HEALHNHYTQ KSLSLSPG <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación Y349C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>
10	30	FcΔ16(-)
15		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYP S DI A VEWESNGQPENNY D TT P VLDS D GSFF LYS D LTVDKSRWQQGNVFSCSV M HEALHNHYTQ KSLSLSPG <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>
20	31	FcΔ10(-,L234A/L235A)
25		APE A AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYP S DI A VEWESNGQPENNY D TT P VLDS DGSFFLYS D LTVDKSRWQQGNVFSCSV M HEALH NHYTQKSLSLSPG <i>Los restos subrayados y en cursiva son las mutaciones L234A y L235A; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>

Los ejemplos de moléculas de Fc se muestran en la Tabla 4, en los que la lisina de C-terminal es opcional.

Tabla 4 – Moléculas de Fc

30	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
35	32	FcΔ10(+,K)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR K EM TKNQVSLTCLVKGFYP S DI A VEWESNGQPENN

		YKTTTPVL <u>K</u> SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>
5	33	FcΔ10(-,K)
10		APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN Y <u>D</u> TTPPVLDSDGSFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>
15	34	FcΔ10(+,K,CC)
20		APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP <u>C</u> R <u>K</u> EM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVL <u>K</u> SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación S354C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>
25	35	FcΔ16(+,K,CC)
30		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP <u>C</u> R <u>K</u> EMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VL <u>K</u> SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación S354C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>
35	36	FcΔ16(+,K)
		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

5		RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <u>K</u> EMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VL <u>K</u> SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>
10	37	FcΔ10(+,K,L234A/L235A) APE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <u>K</u> EM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVVL <u>K</u> SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK <i>Los restos subrayados y en cursiva son las mutaciones L234A y L235A; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>

Las moléculas de Fc se pueden usar para dimerizar con una molécula que comprende un dominio Fc complementario. Por ejemplo, una molécula de Fc de FcΔ10(+,K) puede dimerizar con una molécula que comprende una región de Fc que comprende una delección de bisagra de diez aminoácidos y una mutación de par con carga negativa tal como FcΔ10(-) (por ejemplo, una molécula de GDF15 que comprende una región de Fc de FcΔ10(-)). Una molécula de Fc de FcΔ10(-,K) puede dimerizar con una molécula que comprende una región de Fc que comprende una delección de bisagra de diez aminoácidos y una mutación de par con carga negativa tal como FcΔ10(+) (por ejemplo, una molécula de GDF15 que comprende una región de Fc de FcΔ10(+)).

Una molécula de Fc de FcΔ10(+,K,CC) puede dimerizar con una molécula que comprende una región de Fc que comprende una delección de bisagra de diez aminoácidos y una mutación de par con carga negativa tal como FcΔ10(-, CC) (por ejemplo, una molécula de GDF15 que comprende una región de Fc de FcΔ10(-, CC)). Una molécula de Fc de FcΔ16(+,K,CC) puede dimerizar con una molécula que comprende una región de Fc que comprende una delección de bisagra de diez aminoácidos y una mutación de par con carga negativa tal como FcΔ16(-, CC) (por ejemplo, una molécula de GDF15 que comprende una región de Fc de FcΔ16(-, CC)). Una molécula de Fc de FcΔ16(+,K) puede dimerizar con una molécula que comprende una región de Fc que comprende una delección de bisagra de diez

aminoácidos y una mutación de par con carga negativa tal como FcΔ16(-) (por ejemplo, una molécula de GDF15 que comprende una región de Fc de FcΔ16(+)). Una molécula de Fc de FcΔ10(+,K,L234A/L235A) puede dimerizar con una molécula que comprende una región de Fc que comprende una delección de bisagra de diez aminoácidos y una mutación de par con carga negativa tal como FcΔ10(-, L234A/L235A) (por ejemplo, una molécula de GDF15 que comprende una región de Fc de FcΔ10(-, L234A/ L235A)).

Los ejemplos de moléculas de GDF15 que son proteínas de fusión GDF15-Fc se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 – Moléculas de GDF15

Proteína de fusión GDF15-Fc			Componentes de proteína de fusión GDF15-Fc SEQ ID NO:		
SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia	Región de Fc	Enlazador	Región de GDF15
38	scFc-GDF15	GGGERKSSVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGG SERKSSVECPPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGL	---	---	---

5			PAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSARNGD HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI			
10						
15	39	FcΔ10(-)- (G4S)4- GDF15	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYDTTPPV LDSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSA RNGDHCPLGPGRCCRLHT VRASLEDLGWADWVLSPR EVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones</i>	26	21	6
20						
25						
30						
35						

		<i>K392D y K409D.</i>			
40	FcΔ10(+)- (G4)-GDF15	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSR <u>K</u> EMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPV L <u>K</u> SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGA RNGDHCPGGRCCRLHT VRASLEDLGWADWVLSR EVQVTCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones E356K y D399K.</i>	27	23	6
41	FcΔ10(-)- GDF15(Δ3)	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNY <u>D</u> TTTPPV LDSDGSFFLYS <u>D</u> LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLED	26	---	13

5			LGWADWVLSPREVQVTM CIGACPSQFRAANMHAQIK TSLHRLKPDTVPAPCCVPA SYNPMVLIQKTDGTGVSLQT YDDLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			
10	42	FcΔ10(-)- GDF15(N3D)	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNY D TTTPPV LDSGGSFFLYS D LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGARDGD HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>	26	---	15
15						
20						
25						
30	43	FcΔ10(- ,CC)- GDF15(Δ3)	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ	28	---	13
35						

5		PREPQV <u>Q</u> TLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNY <u>D</u> TTTPPV LDSGDSFFLYS <u>D</u> LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTM CIGACPSQFRAANMHAQIK TSLHRLKPDTVPAPCCVPA SYNPMVLIQKTDGTGVS YDDLAKDCHCI <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación Y349C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>				
20	44	FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D)	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQV <u>Q</u> TLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNY <u>D</u> TTTPPV LDSGDSFFLYS <u>D</u> LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGARDGD HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGTGVS	28	---	15
35						

5

10

15

20

25

30

35

		LQTYDDLLAKDCHCI <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación Y349C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			
45	FcΔ16(-,CC)- GDF15(Δ3/D5E)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ V <u>C</u> TLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TPPVLDSDG SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGGEHCPLGPGR CCRLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTMCIGACP SQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTVPAPCCVPASYNPM VLIQKTDGTGVSLQTYDDLL AKDCHCI <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación Y349C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>	29	---	17
46	FcΔ16(-,CC)- GDF15(N3Q/D5E)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH	29	---	18

5		QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ V <u>Q</u> TLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSDG SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGARQGEHCPLG PGRCCRLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIG ACPSQFRAANMHAQIKTSL HRLKPDTVPAPCCVPASY NPMVLIQKTDGTGVSLQTYD DLLAKDCHCI <i>El resto subrayado y en cursiva es la mutación Y349C; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>				
10						
15						
20						
25	47	FcΔ16(-)- GDF15(N3Q/D5E)	GPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSDG SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGARQGEHCPLG PGRCCRLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIG ACPSQFRAANMHAQIKTSL	30	---	18
30						
35						

5			HRLKPDTVPAPCCVPASY NPMVLIQKTDGVSLSQTYD DLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			
10	48	FcΔ16(-)- (G4Q)4- GDF15	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY D TPPVLDSDG SFFLY S D LTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGQGGGG QGGGGQGGGGQARNGD HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>	30	25	6
30	49	FcΔ16(-)- (G4Q)4- GDF15(N3Q)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT	30	25	14
35						

5

10

15

20

25

30

35

		CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSGD SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGQGGGG QGGGGQGGGGQARQGD HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			
50	FcΔ16(-)- (G4Q)4- GDF15(N3Q /D5E)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSGD SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGQGGGG QGGGGQGGGGQARQGE HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en</i>	30	25	18

		<i>negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			
51	FcΔ16(-)- (G4S)2- GDF15(N3Q)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY D TTTPVLDSGD SFFLYS D LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGG SARQGDHCPLGPGRCCRL HTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQK TDTGVSLQTYDDLAKDC HCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>	30	20	14
52	FcΔ16(-)- (G4S)2- GDF15(N3Q /D5E)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY D TTTPVLDSGD SFFLYS D LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ	30	20	18

5		KSLSLSPGGGGGSGGGG SARQGEHCPLGPGRCCRL HTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDT VPAPCCVPASYNPMVLIQK TDTGVSLQTYDDLLAKDC HCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>				
10						
15	53	FcΔ16(-)- G4S- GDF15(N3Q)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSGD SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSARQGD HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCC VPASYNPMVLIQKTDTGVS LQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>	30	19	14
20						
25						
30						
35	54	FcΔ16(-)- G4S- GDF15(N3Q	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP	30	19	18

5		/D5E)	REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSDG SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSARQGE 10 HCPLGPGRCCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQV TMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVAPCC VPASYNPMVLIQKTDGVS 15 LQTYDDLLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			
20	55	FcΔ16(-)- GDF15(N3Q)	GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ 25 VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNY <u>D</u> TTTPVLDSDG SFFLYS <u>D</u> LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ 30 KSLSLSPGARQGDHCPLG PGRCCRLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIG ACPSQFRAANMHAQIKTSL HRLKPDTVAPCCVPASY 35 NPMVLIQKTDGVSLLQTYD	30	---	14

		DLAKDCHCI <i>Los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>				
5	56	FcΔ10(- ,L234A/L235 A)-(G4Q)4- GDF15(N3Q)	APE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNY D TTPP VLDSGDGSFFLYS D LTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGG QGGGGQGGGGQGGGGQ ARQGDHCPLGPGRCCRL HTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPD VPAPCCVPASYNPMVLIQK TDTGVSLQTYDDLLAKDC HCI <i>Los restos subrayados y en cursiva son las mutaciones L234A y L235A; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>	31	25	14
10						
15						
20						
25						
30						
35	57	FcΔ10(- ,L234A/L235 A)-(G4Q)4- GDF15(N3Q /D5E)	APE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC	31	25	18

5		KVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNY <u>D</u> TTPP VLDSGDGSFFLYS <u>D</u> LTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGG QGGGGQGGGGQGGGGQ ARQGEHCPLGPRCCRLH TVRASLEDLGWADWVLSP REVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDV PAPCCVPASYNPMVLIQKT DTGVSLQTYDDLLAKDCH CI			
10					
15					
20		<i>Los restos subrayados y en cursiva son las mutaciones L234A y L235A; los restos subrayados y en negrita son las mutaciones K392D y K409D.</i>			

En algunas realizaciones, la proteína de fusión es una scFc-GDF15 en la que la región de GDF15 está unida a dos regiones de Fc. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. Al calcular el porcentaje de identidad de secuencia, las secuencias que se comparan se alinean de una manera que da la mayor coincidencia entre las secuencias. Un programa informático que se puede usar para determinar el porcentaje de identidad es el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux et al., (1984) Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). El algoritmo informático GAP se puede usar para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se va a determinar el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias se alinean para la coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos o nucleótidos (el “intervalo de coincidencia”, tal como se determina mediante el algoritmo). Junto con el algoritmo se utiliza una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3x la diagonal promedio, en donde la “diagonal promedio” es el

promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se está usando; la “diagonal” es la puntuación o número asignado a cada coincidencia de aminoácidos perfecta mediante la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que es normalmente 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. En determinadas realizaciones el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véase, Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62). Los parámetros que se pueden usar para determinar el porcentaje de identidad usando el programa GAP son los siguientes:

Algoritmo: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., 1992, citado anteriormente;

Penalización por hueco: 12 (pero sin penalización por huecos finales)

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de solo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta incluso aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, es posible ajustar el método de alineación seleccionado (por ejemplo, el programa GAP), si se desea, para dar como resultado una alineación que se extienda en al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 es FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, FcΔ10(+)-(G4)-GDF15, FcΔ10(-)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-)-GDF15(N3D), FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D), FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E), FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15, FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q), FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) o FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E).

En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57. En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 80-99 %, el 85-99 %, el 90-99 % o el 95-99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57. En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57. En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57. En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57. En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57.

En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 es una molécula de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, FcΔ10(+)-(G4)-GDF15, FcΔ10(-)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-)-GDF15(N3D), FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D), FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E), FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15, FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q), FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) o FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E). En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 es una molécula de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, FcΔ10(+)-(G4)-GDF15, FcΔ10(-)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-)-GDF15(N3D), FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D), FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E), FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15, FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q), FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) o FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) que tiene el 80-99 %, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con su región de Fc y/o su región de GDF15.

En algunas realizaciones, la molécula de GDF15 es una molécula de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, FcΔ10(+)-(G4)-GDF15, FcΔ10(-)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-)-GDF15(N3D), FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3), FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D), FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E), FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15, FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q), FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), FcΔ16(-)-GDF15(N3Q), FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) o FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con su región de Fc y/o su región de GDF15. Por ejemplo,

una molécula de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 con el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con su región de Fc y/o con su región de GDF15 incluye una molécula de GDF15 con una región de Fc que tiene una delección de diez aminoácidos de la región de bisagra y una mutación de par con carga negativa y tiene el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26 y/o una región de GDF15 que tiene el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, una molécula de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 con al menos el 85%, el 90%, el 95% o el 99% de identidad de secuencia con su región de Fc y/o con su región de GDF15, incluye una molécula de GDF15 con una región de Fc que tiene una delección de diez aminoácidos de la región de bisagra y tiene una mutación de par con carga negativa y tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26 y/o una región de GDF15 que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En otro ejemplo, una molécula de FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) con el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con su región de Fc y/o una región de GDF15, incluye una molécula de GDF15 con una región de Fc que tiene una delección de dieciséis aminoácidos de la región de bisagra y una mutación de par con carga negativa que tiene el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30 y/o una región de GDF15 que tiene el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18. En otro ejemplo, una molécula de FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) con al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con su región de Fc y/o una región de GDF15, incluye una molécula de GDF15 con una región de Fc que tiene una delección de dieciséis aminoácidos de la región de bisagra y una mutación de par con carga negativa que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30 y/o una región de GDF15 que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

En otro ejemplo más, una molécula de FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) con el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con su región de Fc y/o una región de GDF15, incluye una molécula de GDF15 con una región de Fc que tiene una delección de diez aminoácidos de la región de bisagra, una mutación de par con carga negativa y mutaciones de leucina a alanina en las posiciones 234 y 235 y tiene el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31 y/o una región de GDF15 que tiene el 80-99%, el 85%-99%, el 90-99% o el 95-99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18. En otro ejemplo más, una molécula de FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) con al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %

o el 99 % de identidad de secuencia con su región de Fc y/o una región de GDF15 incluye una molécula de GDF15 con una región de Fc que tiene una delección de diez aminoácidos de la región de bisagra, una mutación de par con carga negativa y mutaciones de leucina a alanina en las posiciones 234 y 235 y tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31 y/o una región de GDF15 que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

También se proporcionan en el presente documento dímeros y tetrámeros que comprenden una molécula de GDF15 proporcionada en el presente documento. En una realización, el dímero comprende una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 39-57. En algunas realizaciones, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36 o 37 (en la que la lisina de C-terminal es opcional) tal como se muestra en la Tabla 6. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el dímero es Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15: Fc Δ 10(+,K). En otra realización, el dímero es Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q): Fc Δ 10(+,K,L234A/L235A). En otra realización más, el dímero es Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q):Fc Δ 10(+,K,L234A/L235A).

Tabla 6 – Dímeros

SEQ ID NO. de la fusión GDF15-Fc	Nombre de la fusión GDF15-Fc	SEQ ID NO. de la molécula de Fc	Nombre de la molécula de Fc correspondiente
39	Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15	32	Fc Δ 10(+,K)
40	Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15	33	Fc Δ 10(-,K)
41	Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3)	32	Fc Δ 10(+,K)
42	Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D)	32	Fc Δ 10(+,K)
43	Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3)	34	Fc Δ 10(+,K,CC)
44	Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D)	34	Fc Δ 10(+,K,CC)
45	Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E)	35	Fc Δ 16(+,K,CC)
46	Fc Δ 16(-,CC)-	35	Fc Δ 16(+,K,CC)

	GDF15(N3Q/D5E)		
47	FcΔ16(-)- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
48	FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15	36	FcΔ16(+,K)
49	FcΔ16(-)-(G4Q)4- GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
50	FcΔ16(-)-(G4Q)4- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
51	FcΔ16(-)-(G4S)2- GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
52	FcΔ16(-)-(G4S)2- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
53	FcΔ16(-)-G4S- GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
54	FcΔ16(-)-G4S- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
55	FcΔ16(-)-GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
56	FcΔ10(-,L234A/L235A)- (G4Q)4-GDF15(N3Q)	37	FcΔ10(+,K,L234A/L235A)
57	FcΔ10(-,L234A/L235A)- (G4Q)4- GDF15(N3Q/D5E)	37	FcΔ10(+,K,L234A/L235A)

En una realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 32 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 33 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 32 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 32 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 34 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 34 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una

fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 34 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 35 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 35 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 36 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 37 (lisina de C-terminal opcional). En otra realización, una fusión GDF15-Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 dimeriza con una molécula de Fc que comprende la SEQ ID NO: 37 (lisina de C-terminal opcional).

En algunas realizaciones, los dímeros forman tetrámeros. Por ejemplo, los dímeros en la Tabla 6 pueden formar tetrámeros. En algunas realizaciones, los tetrámeros se forman a partir de los mismos dímeros. En algunas realizaciones, dos dímeros de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15:FcΔ10(+,K); FcΔ10(+)-(G4)-GDF15:FcΔ10(-,K); FcΔ10(-)-GDF15(Δ3):FcΔ10(+,K);

FcΔ10(-)-GDF15(N3D):FcΔ10(+,K); FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3):FcΔ10(+,K,CC); FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D):FcΔ10(+,K,CC); FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E):FcΔ16(+,K,CC); FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K,CC); FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15:FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K); FcΔ16(-)-GDF15(N3Q):FcΔ16(+,K); FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q):FcΔ10(+,K,L234A/L235A) o FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ10(+,K,L234A/L235A) forman un tetrámero, tal como a través de la dimerización de las dos regiones de GDF15.

También se proporcionan en el presente documento células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos y los vectores para producir las moléculas de GDF15 y Fc divulgadas en el presente documento. En diversas realizaciones, el vector o el ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula hospedadora, que en otras realizaciones, el vector o el ácido nucleico es extracromosómico.

Se proporcionan las células recombinantes, tal como células de levadura, bacterianas (por ejemplo, *E. coli*) y células de mamífero (por ejemplo células de mamífero inmortalizadas) que comprenden dicho ácido nucleico, vector o combinaciones de cualquiera o ambos de los mismos. En diversas realizaciones, las células que comprenden un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, un cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal que comprende una secuencia que codifica la expresión de una molécula de GDF15 y/o una molécula de Fc. En algunas realizaciones, la célula comprende un ácido nucleico para la producción de una molécula de GDF15 y otra célula comprende un ácido nucleico para la producción de una molécula de Fc para la dimerización con la molécula de GDF15 (por ejemplo, un vector para codificar una molécula de GDF15 en una célula y un segundo vector para codificar una molécula de Fc en una segunda célula). En otras realizaciones, una célula hospedadora comprende un ácido nucleico para la producción de una molécula de GDF15 y una molécula de Fc (por ejemplo, un vector que codifica ambas moléculas). En otra realización, una célula hospedadora comprende un ácido nucleico para producir una molécula de GDF15 y otro ácido nucleico para producir una molécula de Fc (por ejemplo, dos vectores separados, uno que codifica una molécula de GDF15 y uno que codifica una molécula de Fc en una única célula hospedadora).

Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de GDF15 y/o una molécula de Fc se puede introducir en una célula hospedadora mediante transformación o transfección, tal como mediante métodos conocidos en la materia.

Un ácido nucleico que codifica una molécula de GDF15 se puede colocar dentro y/o

administrar a una célula hospedadora o animal hospedador a través de un vector vírico. Un vector vírico puede comprender cualquier número de polinucleótidos víricos, solo o en combinación con una o más proteínas víricas, lo que facilita la administración, replicación y/o expresión del ácido nucleico de la invención en una célula hospedadora deseada. El vector vírico puede ser un polinucleótido que comprende todo o parte de un genoma vírico, un conjugado de proteína/ácido nucleico vírico, una partícula de tipo vírico (VLP), o una partícula de virus intacta que comprende ácidos nucleicos víricos y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una región de GDF15. Un vector vírico de partícula vírica puede comprender una partícula vírica de tipo silvestre o una partícula vírica modificada. El vector vírico puede ser un vector que requiere la presencia de otro vector o virus de tipo silvestre para la replicación y/o expresión (por ejemplo, un vector vírico puede ser un virus dependiente de colaborador) tal como un amplicón de vector adenovírico. Las partículas de vector vírico adecuadas en este sentido incluyen, por ejemplo, partículas de vector adenovírico (incluyendo cualquier virus de o que deriva de un virus de *adenoviridae*), partículas de vector vírico adenoasociado (partículas de vector AAV) u otros parvovirus y partículas de vector parvovírico, partículas de vector papilomavírico, vectores flavivíricos, vectores alfavíricos, vectores víricos de herpes, vectores de virus pox, vectores retrovíricos, incluyendo vectores lentivíricos.

Una molécula de GDF15 se puede aislar usando métodos convencionales de purificación de proteínas. Un polipéptido que comprende una región de GDF15 se puede aislar de una célula que se ha diseñado genéticamente para que exprese un polipéptido que comprende una región de GDF15, por ejemplo, una célula que no expresa de manera natural GDF15 natural. Los métodos de purificación de proteínas conocidos en la materia se pueden emplear para aislar moléculas de GDF15, así como materiales y reactivos asociados. Los métodos de purificación de una molécula de GDF15 también se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento. Los métodos de purificación adicionales que pueden ser útiles para aislar moléculas de GDF15 se pueden encontrar en referencias tales como Bootcov MR, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11514-9, Fairlie WD, 2000, *Gene* 254: 67-76.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de GDF15 (y opcionalmente, una molécula de Fc, tal como un dímero o tetrámero divulgado en el presente documento). Dichas composiciones farmacéuticas de polipéptido pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de GDF15 mezclada con un agente de formulación o vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado para la adecuación con el modo de administración. El agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable puede ser uno o más agentes de formulación adecuados para lograr o mejorar la administración de una molécula de GDF15 en

el cuerpo de ser humano o sujeto no humano. Las sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia de la molécula de GDF15 también pueden actuar como, o formar un componente de, un vehículo de la formulación. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferentemente no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica puede contener agente o agentes de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolalidad, la viscosidad, la claridad, el color, isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución o de liberación, la adsorción o la penetración de la composición.

La cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende una molécula de GDF15 que se va a emplear de manera terapéutica dependerá, por ejemplo, del ámbito terapéutico y de los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, por lo tanto, variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, de la indicación para la que se esté usando una molécula de GDF15, de la vía de administración, y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y de la condición del sujeto (la edad y la salud en general). La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de GDF15 en la formulación que se esté usando.

La vía de administración de la composición farmacéutica se puede administrar por vía oral; mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida (que también se pueden inyectar); o mediante dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones se pueden administrar mediante la inyección de bolos o de manera continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación. La composición también se puede administrar de forma local a través de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado en el que la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser a mediante difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

Una molécula de GDF15 se puede usar para tratar, diagnosticar o mejorar una afección o trastorno metabólico. En una realización, el trastorno metabólico es diabetes, por ejemplo, diabetes de tipo 2. En otra realización, la afección o el trastorno metabólico es obesidad. En otras realizaciones, la afección o el trastorno metabólico es dislipidemia, niveles elevados de glucosa, niveles elevados de insulina o nefropatía diabética. Por ejemplo, una afección o trastorno metabólico que se puede tratar o mejorar usando una molécula de GDF15

incluye un estado en el que el sujeto humano tiene un nivel de glucosa en sangre en ayunas de 125 mg/dl o más, por ejemplo, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200 o más de 200 mg/dl. Los niveles de glucosa en sangre se pueden determinar en ayunas o habiendo comido o al azar. La afección o trastorno metabólico también puede comprender una afección en la que un sujeto está en elevado riesgo de desarrollar una afección metabólica. Para un sujeto humano, tales afecciones incluyen un nivel de glucosa en sangre en ayunas de 100 mg/dl. Las afecciones que se pueden tratar usando una composición farmacéutica que comprende una molécula de GDF15 también se pueden encontrar en American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes Care 2011, American Diabetes Association, *Diabetes Care* Vol. 34, Suplemento N.º 1, S11-S61, 2010.

La administración se puede realizar tal como mediante inyección intravenosa (IV), inyección intraperitoneal (IP), inyección subcutánea, inyección intramuscular u oralmente en la forma de un comprimido o formación líquida. Una dosis terapéuticamente eficaz de una molécula de GDF15 dependerá de la pauta de administración, de la dosis unitaria de agente administrado, de si la molécula de GDF15 se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, del estado inmunológico y de la salud del receptor. Una dosis terapéuticamente eficaz es una cantidad de una molécula de GDF15 que genera una respuesta biológica o médica en un sistema tisular, animal o ser humano vista por un investigador, un médico u otro facultativo, que incluye el alivio o la mejora de los síntomas de la enfermedad o del trastorno que se está tratando, es decir, una cantidad de una molécula de GDF15 que garantiza un nivel observable de una o más respuestas biológicas o médicas deseadas, por ejemplo, una reducción de los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos o colesterol en sangre; la reducción del peso corporal; la mejora de la tolerancia a la glucosa, del gasto energético o de la sensibilidad a la insulina; o la reducción de la ingesta de alimento. Una dosis terapéuticamente eficaz de una molécula de GDF15 también puede variar con el resultado deseado.

También se proporciona en el presente documento un método que comprende medir un nivel de partida de uno o más compuestos metabólicamente relevantes tales como glucosa, insulina, colesterol, lípido en un sujeto, administrar una composición farmacéutica que comprende una molécula de GDF15 al sujeto, y después de un período de tiempo deseado, medir el nivel de los uno o más compuestos metabólicamente relevantes (por ejemplo, glucosa, insulina, colesterol, lípido en sangre) en el sujeto. Los dos niveles se pueden comparar después para determinar el cambio relativo en el compuesto metabólicamente relevante en el sujeto. En función del resultado de esa comparación, se puede administrar otra dosis de la composición farmacéutica para lograr un nivel deseado de uno o más compuestos metabólicamente relevantes.

Se puede coadministrar una composición farmacéutica que comprende una molécula

de GDF15 con otro compuesto o agente terapéutico. Se puede administrar una molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente) en combinación con otro agente terapéutico, tal como un agente que reduce los niveles de glucosa, insulina, triglicérido o colesterol en sangre; reduce el peso corporal; reduce la ingesta de alimento; mejora la tolerancia a la glucosa, el gasto energético o la sensibilidad a la insulina; o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, agente antidiabetes, agente hipolipidémico, agente antiobesidad, agente antihipertensivo o agonista del receptor activado por proliferador de peroxisoma). La identidad y las propiedades de un compuesto coadministrado con la molécula de GDF15 dependerá de la naturaleza de la afección a tratar o mejorar. El agente administrado con una molécula de GDF15 divulgado en el presente documento puede ser un agonista de GLP-1R, tal como GLP-1 o un análogo del mismo; o una exendina, un análogo de exendina o un agonista de exendina. Un listado no limitante de ejemplos de compuestos que se pueden administrar en combinación con la composición farmacéutica incluye liraglutida, rosiglitazona, pioglitazona, repaglinida, nateglitinida, metformina, exenatida, estiaglipatina, pramlintida, glipizida, glimepirideacarbosa, orlistat, lorcaserina, fenterminatopiramato, naltrexonabupropiona, setmelanotida, semaglutida, efpeglenatida, canagliflozina, LIK-066, SAR-425899, Tt-401, FGFR4Rx, HDV-biotina y miglitol.

En una realización, una molécula de GDF15 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57 se administra con otro compuesto o agente terapéutico, tal como liraglutida.

En otra realización, una molécula de GDF15 y la molécula de Fc correspondiente que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39 y 32 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 40 y 33 (lisina de C-terminal opcional), las SEQ ID NO: 41 y 32 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 42 y 32 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 43 y 34 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 44 y 34 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 45 y 35 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 46 y 35 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 47 y 36 (lisina de C-terminal opcional) respectivamente; las SEQ ID NO: 48 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 49 y 36 (lisina de C-terminal opcional) respectivamente; las SEQ ID NO: 50 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 51 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 52 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 53 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 54 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 55 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 56 y 37 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; o las SEQ ID NO: 57 y

37 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; se administran con otro compuesto o agente terapéutico, tal como liraglutida.

En otra realización, una molécula de GDF15 y la molécula de Fc correspondiente que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 50 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente, se administran con otro compuesto o agente terapéutico, tal como liraglutida. En otra realización, una molécula de GDF15 y la molécula de Fc correspondiente que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 57 y 37 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente, se administran con otro compuesto o agente terapéutico, tal como liraglutida.

Una molécula de GDF15 administrada con otro agente terapéutico puede incluir la administración concurrente de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente) y una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente terapéutico. Una molécula de GDF15 administrada con otro agente terapéutico puede incluir la administración posterior de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente) y una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente terapéutico, por ejemplo, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente) seguido por una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente terapéutico o la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente terapéutico seguido por la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y, opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente). La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente) puede ser al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente terapéutico. En otra realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente terapéutico puede ser al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después, al menos, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente).

Una molécula de GDF15 administrada de manera concurrente con otro agente terapéutico puede comprender la administración de una composición que comprende tanto la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente) y el otro agente terapéutico, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de GDF15 (y opcionalmente su molécula de Fc correspondiente) se combina con una cantidad terapéuticamente eficaz del otro agente antes de la administración. En otra realización, la administración concurrente de la molécula de GDF15 (y opcionalmente, su molécula de Fc

correspondiente) y otro agente terapéutico puede comprender la administración concurrente de una primera composición que comprende la molécula de GDF15 y una segunda composición que comprende el otro agente terapéutico.

En algunas realizaciones, la administración de una molécula de GDF15 con otro agente terapéutico tiene un efecto sinérgico. En una realización, el efecto es mayor que la molécula de GDF15 (y opcionalmente su molécula de Fc correspondiente) solo o el otro agente. En otra realización, el efecto es mayor que un efecto aditivo de ambos agentes (la molécula de GDF15 y, opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente más el otro agente). En una realización, la terapia de combinación (es decir, la administración de una molécula de GDF15, opcionalmente con su molécula de Fc correspondiente, con otro agente terapéutico) tiene un efecto 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 veces mayor que la monoterapia de GDF15 (administración de la molécula de GDF15 y, opcionalmente, su molécula de Fc correspondiente). En otra realización, la terapia de combinación (es decir, la administración de una molécula de GDF15, opcionalmente con su molécula de Fc correspondiente, con otro agente terapéutico) tiene un efecto 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 veces mayor que la monoterapia con el otro agente. El efecto puede ser la cantidad de pérdida de peso corporal (por ejemplo, la reducción de la masa total o el porcentaje de cambio corporal); la reducción de los niveles de glucosa, insulina, triglicérido o colesterol en sangre; la mejora en la tolerancia a la glucosa, el gasto energético o la sensibilidad a la insulina; o la reducción de la ingesta de alimento. El efecto sinérgico puede ser aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 o 70 días después de la administración.

En una realización, una molécula de GDF15 y la molécula de Fc correspondiente que comprenden las secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39 y 32 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 40 y 33 (lisina de C-terminal opcional), las SEQ ID NO: 41 y 32 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 42 y 32 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 43 y 34 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 44 y 34 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 45 y 35 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 46 y 35 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 47 y 36 (lisina de C-terminal opcional) respectivamente; las SEQ ID NO: 48 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 49 y 36 (lisina de C-terminal opcional) respectivamente; las SEQ ID NO: 50 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 51 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 52 y 36

(lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 53 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 54 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 55 y 36 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; las SEQ ID NO: 56 y 37 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; o las SEQ ID NO: 57 y 37 (lisina de C-terminal opcional), respectivamente; administradas con un agonista de GLP-1R (por ejemplo, liraglutida o exendina, o un análogo o agonista de la misma) tienen un efecto 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 veces mayor que la monoterapia de GDF15; un efecto 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 veces mayor que la monoterapia del agonista de GLP-1R (es decir, la administración del agonista de GLP-1R solo); o ambos, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 o 70 días después de la administración del agente (o de los agentes).

La descripción detallada y los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no se deben interpretar como limitantes de la presente invención. Los expertos en la materia pueden realizar diversos cambios y modificaciones basándose en la descripción de la invención, y dichos cambios y modificaciones también están incluidos en la presente invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados logrados, se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1: Moléculas GDF15(TS)-Enlazador-Fc

Se produjeron las moléculas de GDF15 de scFc-GDF15 (SEQ ID NO: 38) y FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) y se probó la actividad de las moléculas.

FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) se expresó de manera estable en una línea celular CHO-K1 adaptada en suspensión y sin suero. Se clonó en un vector de expresión estable que contiene resistencia a puomicina mientras que la cadena de Fc para formar un heterodímero con FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, FcΔ10(+,K) (SEQ ID NO: 32), se clonó en un vector de expresión que contiene higromicina (Selexis, Inc.). Los plásmidos se transfectaron a una proporción de 1:1 usando lipofectamina LTX y las células se seleccionaron 2 días después de la transfección en un medio de crecimiento propietario que contiene 10 ug/ml de puomicina y 600 ug/ml de higromicina. El medio se cambió 2 veces por semana durante la selección. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 90 % de viabilidad, se aumentó proporcionalmente para un funcionamiento de producción en lotes. Las células se sembraron

a 2×10^6 /ml en medio de producción. El medio acondicionado (CM) producido por las células se recolectó el día 7 y se aclaró. Las viabilidades del punto final normalmente estaban por encima del 90 %.

Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) (y cualquier Fc emparejado) se clarificó. El medio acondicionado se purificó usando un procedimiento de cromatografía de dos etapas. Aproximadamente se aplicaron 5 litros de CM directamente a una columna GE MabSelect SuRe que se había equilibrado previamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco. La proteína unida se sometió a tres etapas de lavado: en primer lugar, 3 volúmenes de columna (VC) de PBS; a continuación, 1 VC de Tris 20 mM, cloruro de sodio de 100 mM a pH 7.4; y finalmente 3 VC de L-arginina 500 mM a pH 7.5. Estas etapas de lavado eliminan los componentes del medio no unidos o ligeramente unidos y las impurezas de las células hospedadoras. Después la columna se volvió a equilibrar con 5 VC de Tris 20 mM, cloruro de sodio 100 mM a pH 7.4 que devolvió la absorbancia en UV al nivel de partida. La proteína deseada se eluyó con ácido acético 100 mM a pH 3.6 y se recogió en masa. El conjunto de proteínas se tituló rápidamente en un intervalo de pH de 5.0 a 5.5 con Tris-HCl 1 M, a pH 9.2. A continuación, el conjunto de proteínas con pH ajustado se cargó en una columna GE SP Sepharose® HP que se había equilibrado previamente con ácido 2-etanosulfónico 20 mM (MES) a pH 6.0. Después se lavó la proteína unida con 5 VC de tampón de equilibrio, y finalmente se eluyó en un gradiente lineal de 20 VC del 0 al 50 % de cloruro sódico de 0 a 400 mM en MES 20 mM a pH 6.0. Se recolectaron las fracciones durante la elución y se analizaron mediante cromatografía analítica por exclusión de tamaño (Superdex® 200) para determinar las fracciones apropiadas que se han de unir para un producto homogéneo. La cromatografía SP HP elimina las impurezas asociadas al producto tales como Fc libre, especies truncadas y multímeros de Fc-GDF15. Al conjunto de la SP HP se le intercambió el tampón en acetato de sodio 10 mM, prolina al 5 %, a pH 5.2 mediante diálisis. Se concentró a aproximadamente 15 mg/mL usando el dispositivo de centrifuga Sartorius Vivaspin®20 con un umbral de diez kilodalton de peso molecular. Finalmente, se esterilizó por filtración y la solución resultante que contiene las moléculas de Fc-GDF15 purificadas se almacenó a 5 °C. Se evaluaron la identidad y la pureza de los productos finales usando el análisis de espectrometría de masas, la electroforesis en poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y la cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño.

Se produjo ScFc-GDF15 (SEQ ID NO: 38) de forma similar. Esta molécula de GDF15 se expresó de manera estable en una línea celular de CHO/CS9. Las moléculas se clonaron en un vector de expresión estable. Los plásmidos (linearizados) se transfectaron a una proporción de 1:1 usando la electroporación y las células se seleccionaron 2 días tras la transfección. El medio se cambió 3 veces por semana durante la selección. Cuando las

células alcanzaron aproximadamente el 90% de viabilidad, se aumentaron proporcionalmente para un funcionamiento de producción en lotes. Las células se sembraron a 1×10^6 /ml/ en medio de producción y se alimentaron una vez cuando el número de células alcanzó $4 - 5 \times 10^6$ /ml. El medio acondicionado (CM) producido por las células se recolectó el día 10 y se aclaró. Las viabilidades del punto final normalmente estaban por encima del 90 %. Se aclaró ScFc-GDF15 y el medio acondicionado se purificó usando un procedimiento de cromatografía acoplada de dos etapas. Se agrupó el medio acondicionado de múltiples recolecciones y se concentró aproximadamente 5 veces mediante ultrafiltración usando una membrana de celulosa regenerada de 10 kD de 1 pie cuadrado de Pellicon® 2 (Millipore) mediante filtración de flujo tangencial. Aproximadamente se aplicaron 5 litros de CM concentrado directamente a una columna GE MabSelect SuRe que se había equilibrado previamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco. La proteína unida de manera no específica se eliminó mediante una etapa de lavado con 12 VC de PBS. La proteína deseada se eluyó con ácido acético al 0.5% a pH 3.5, NaCl 150 mM en 3 VC y se recolectó en un bucle de almacenamiento. El conjunto de proteínas recolectadas se cargó directamente en una columna de dimensionado GE HiLoad 26/60 Superdex 200 Prep Grade que se había equilibrado previamente con acetato 30 mM a pH 5.0, NaCl 150 mM. Las fracciones del pico recolectadas durante la puesta en marcha del dimensionado se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio para determinar las fracciones apropiadas que se han de unir para un producto homogéneo. El pH del grupo de dimensionado final se ajustó a un pH de 4.5, con la adición de ácido acético glacial al 10% y después se intercambió el tampón a acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9% (p/v), a pH 4.5 mediante diálisis. Se concentró a más de 15 mg/ml usando un dispositivo de centrifuga con un umbral de diez kilodalton de peso molecular. La estabilidad de la proteína al congelado se probó mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. Finalmente, el lote final se esterilizó por filtración y la solución resultante que contiene las moléculas de GDF15 purificadas se almacenó a -80°C . Se evaluaron la identidad y la pureza de los productos finales usando el análisis de espectrometría de masas, la secuenciación en n-terminal, la electroforesis en poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y la cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño.

La actividad de scFc-GDF15 y Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 se analizó para la actividad *in vivo*. A los monos cinomolgos ($n = 10$ por grupo) se les administró vehículo, 3 mg/kg del control positivo FGF21-Fc, 1.5 mg/kg de scFc-GDF15 o 1.5 mg/kg de Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15:Fc Δ 10(+,K) semanalmente durante seis semanas, seguido por un período de reposo farmacológico de cinco semanas. Se determinaron el peso corporal y los niveles de triglicéridos. Los monos cinomolgos macho espontáneamente obesos que no se habían

expuesto previamente se preseleccionaron en términos de salud y tenían un índice de masa corporal de >41 . Los monos se adaptaron a las jaulas individuales y a los procedimientos y manejos experimentales durante 6 semanas antes del tratamiento. Los monos se clasificaron en 4 grupos que recibieron una inyección SC por semana durante 6 semanas (días 0, 7, 14, 21, 28 y 35) para que cada grupo tuviese unos valores de partida similares. Se tomaron muestras de sangre en ayudas durante la noche en los días de antes de la dosis -24, -17 y -10, y en los días 6, 13, 20, 27, 34 y 41 (6 días después de cada dosis semanal) durante la fase de tratamiento. Durante la fase de reposo farmacológico, se tomaron muestras de sangre en los días 48, 55, 62, 69 y 76. El peso corporal se midió una vez a la semana y la ingesta de alimento se controló diariamente para cada mono a lo largo del estudio. Cada mono recibió alimento ilimitado durante una cantidad limitada de tiempo (1 hora) en la alimentación de la mañana y de la tarde, con aproximadamente 8 horas de diferencia. Se les proporcionó un aperitivo de manzana de 150 g durante una cantidad limitada de tiempo (1 hora) entre las comidas. La comida o manzana restante se retiró y se pesó después de cada comida o aperitivo para calcular la ingesta de alimento.

Las proteínas de fusión GDF15-Fc redujeron el peso corporal (**Figura 1**) y los niveles de triglicérido (**Figura 2**), de manera similar a la FGF21-Fc.

Ejemplo 2: Atributos de la molécula GDF15(TS)-Enlazador-Fc

La molécula de Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) tal como se describe en el Ejemplo 1 y la Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15 (SEQ ID NO: 40) se analizaron en cuanto a atributos que pueden afectar a su estabilidad y a su fabricación (por ejemplo, para la fabricación comercial). Se determinó que las moléculas de GDF15 (por ejemplo Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 y Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15) eran altamente heterogéneas (por ejemplo, el análisis de una fracción de columna de intercambio iónico de Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 muestra que la molécula es altamente heterogénea, **Figura 3**), una característica no deseada para la fabricación de una molécula. Para determinar los atributos de las moléculas de GDF15 que puedan dar como resultado una población altamente heterogénea, se realizó un análisis de las moléculas mediante cromatografía por exclusión de tamaño, gel SDS PAGE y espectrometría de masas. Una ausencia de diferencias en el tiempo de retención mediante la cromatografía por exclusión de tamaño indicó que es poco probable que la agregación o la degradación bruta sean responsables de la heterogeneidad. También hubo una ausencia de diferencia en un gel SDS PAGE, lo que indica que también es poco probable que un error de emparejamiento o degradación bruta de disulfuro sea responsable de la heterogeneidad.

También se realizó el análisis de MS para evaluar la heterogeneidad de Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39). La molécula de GDF15 se purificó usando mono S, se recolectaron 1 ml de columna y fracción número 25 (P1), fracción número 28 (P2) y fracción

número 31 (P3) (**Figura 3**) y se sometieron al análisis de MS. Aproximadamente 50 µg de las fracciones se secaron, se resuspendieron en 25 µl de Tris 150 mM, a pH 7.5/ urea 8M/ hidroxilamina 40 mM/DTT 10 mM, y después se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las muestras se alquilaron con yodoacetamida (IAM) 20 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se diluyeron las muestras a 100 µl con agua y 2 µg de tripsina (1:25) y se digirieron toda la noche a 37°C. Los compuestos digeridos se acidificaron seguido por la inyección en un sistema Waters (Milford, MA) NanoAcquity UPLC. Las muestras se cargaron en primer lugar en una columna de captura Symmetry C18 de 180 µm X 20 mm a 15 µl/min, seguido por la separación del péptido en una columna 300SB-C18 Agilent (Santa Clara, CA) Zorbax de 0.5 mm X 250 mm. El tampón A fue de ácido fórmico al 0.1 %/ agua, mientras que el tampón B fue de ácido fórmico al 0.1%/ acetonitrilo al 99.9%. El gradiente consistió en las condiciones iniciales del 1 % de B, seguido por un aumento al 45 % de B durante 85 minutos, al 97 % de B durante 1 minuto, isocrático al 97 % de B durante 6 minutos, al 1 % de B durante 3 minutos y después isocrático al 1 % de B durante 20 minutos. El efluente de la columna de UPLC se pulverizó en un espectrómetro de masas Orbitrap Velos Pro de Thermo Fisher Scientific (San José, CA) usando la fuente de ionización de ionización por electrospray calentado II (HESI II). El método del espectrómetro de masas consistió en un barrido completo del MS de [300-2000] *m/z* a una resolución de 30K seguido por MS/MS (activación de CID) de los 10 primeros iones precursores más abundantes. Se usaron los siguientes parámetros instrumentales para el análisis: voltaje de la fuente= 3.5 kV; temperatura capilar= 275 °C; nivel de RF de lente-S = 50 %; tiempo de activación = 10 msec; energía de colisión normalizada= 35; anchura de aislamiento= 2.0 Da; y umbral= 1.0E4. Se usó el componente Xtract del programa informático Thermo Xcalibur 2.1 para la deconvolución de los datos de MS de alta resolución. Los datos promedio de [300-2000] se deconvolucionaron usando un umbral de S/N de 1.2 y una resolución de 100,000 a 400 *m/z*. Las masas deconvolucionadas del péptido (glucosilado y no glucosilado) se presentaron como monoisotópicas [M+H]⁺. Las diversas especies glucosiladas se confirmaron mediante la pérdida gradual de subunidades de glicano y la presencia de ion precursor no glucosilado como el fragmento más intenso tras la activación de CID.

Los resultados de MS demostraron que los grados variables de especies desamidadas (por ejemplo, el 70 % de P1, el 47 % de P2 y el 24 % de P3) y la distribución de la glucosilación (principalmente de monosacárido y trisacárido) en el enlazador contribuían a una naturaleza altamente heterogénea de la molécula de GDF15 tal como se muestra en el perfil de CEX (**Figura 3**). Se determinó que el enlazador de (G4S)₄ (por ejemplo, presente en FcΔ10(-)-(G4S)₄-GDF15) estaba altamente glucosilado y fosforilado, con grados y tipos variables de glucosilación y/o de fosforilación, y el extremo N-terminal del fragmento activo del

GDF15 humano de tipo silvestre era altamente susceptible de la desamidación y la isomerización (véase, por ejemplo, la **Figura 4**, que muestra determinadas masas extraídas de los datos completos del espectro de masas que se corresponden con especies no modificadas, desamidadas e isomerizadas del péptido que contiene asparagina en la posición 3. Las masas extraídas fueron de [590.25-590.75] m/z de las versiones doblemente cargadas del péptido). La asparagina en la posición 3 (en referencia con la SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos que codifica el fragmento activo del hGDF15) era altamente susceptible a la desamidación e isomerización y el aspartato en la posición 5 (en referencia a la SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos que codifica el fragmento activo del hGDF15) era altamente susceptible a la isomerización.

Basándose en estos atributos, la fabricación de una población generalmente homogénea de una proteína de fusión GDF15-Fc que tiene el fragmento activo del GDF15 humano de tipo silvestre con un enlazador a la región de Fc (por ejemplo, para la fabricación comercial) sería un desafío.

Ejemplo 3: Actividad de las proteínas de fusión GDF15-Fc sin un enlazador

Para abordar los problemas de heterogeneidad descritos en el Ejemplo 2, nuevas proteínas de fusión GDF15-Fc en las que 1) se eliminó el enlazador entre la región de GDF15 y la región de Fc y 2) se eliminó o se sustituyó los restos en N-terminal del fragmento activo del GDF15 humano de tipo silvestre (por ejemplo, GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 13), en donde los tres primeros aminoácidos del fragmento activo del GDF15 humano de tipo silvestre están delecionados, o GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 16) en el que la asparagina en la posición 3 del fragmento activo del GDF15 humano de tipo silvestre está mutado a aspartato).

Además de la mutación del par con carga en la región de Fc de la proteína de fusión GDF15-Fc y la molécula de Fc para la asociación no covalente de la molécula de Fc a la región de Fc de la proteína de fusión de GDF15-Fc para formar un heterodímero, se diseñaron algunas de las moléculas nuevas para que también incluyesen un enlace disulfuro intercatenario en la región de CH₃, o un “pinzamiento de cisteína” (moléculas que incluyen “CC” en su nombre) para aumentar la heterodimerización de la molécula GDF-Fc con una molécula de Fc.

Se generaron cuatro nuevas proteínas de fusión GDF15-Fc en las que 1) el enlazador entre la región de GDF15 y la región de Fc estaba delecionada y 2) los restos de N-terminal de GDF15 estaban eliminados o sustituidos. En dos de las cuatro moléculas, también se introdujo un enlace disulfuro intercatenario en el dominio de CH₃ de la región de Fc de la proteína de fusión GDF15-Fc (así como su molécula de Fc correspondiente para la heterodimerización). La potencia y las propiedades farmacocinéticas (PK) de estas moléculas (Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 41); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); Fc Δ 10(-,CC)-

GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 43); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44)) se compararon con la generación temprana de Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39), en ratones.

Para determinar la potencia de las moléculas, se determinó la ingesta de alimento. Los ratones ob/ob macho de siete a ocho semanas de vida en jaulas separadas se clasificaron en diferentes grupos de tratamiento, teniendo cada grupo unos niveles de peso corporal y de ingesta de alimento comparables antes del tratamiento. A los animales se les trató con 0.32 ug/kg, 1.6 ug/kg, 8 ug/kg, 40 ug/kg, 0.2 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg de una proteína de fusión GDF15-Fc (un dímero de Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 41 y 32); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D):Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 42 y 32); o Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K,CC) (SEQ ID NO: 39 y 32)) mediante inyección subcutánea y se midió la ingesta de alimento durante toda la noche. Los datos presentados son un promedio de 2-4 estudios independientes (**Figura 5**). Las cuatro nuevas moléculas, Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 41); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 43); y Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44), tenían una potencia comparable como la generación más temprana de proteínas de fusión GDF15-Fc, Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39).

Para determinar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas, a los ratones C57Bl/6 macho de 18 semanas de vida, con obesidad inducida por la dieta se les dio una dosis de 1 mg/kg de proteína por vía subcutánea, y se realizó un muestreo en serie a 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 y 336 horas tras la dosis. Las cuatro nuevas moléculas, Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 41); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 43); y Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44) tenían propiedades farmacocinéticas comparables como la generación más temprana de proteínas de fusión GDF15-Fc, Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) (**Figura 6**).

Ejemplo 4: Diseño adicional de proteínas de fusión GDF15-Fc sin un enlazador

Dado que las moléculas recién diseñadas con unos atributos de fabricación y de estabilidad mejorados tenían una potencia y unas propiedades PK similares a las de la molécula de generación más temprana, las moléculas se diseñaron adicionalmente para reducir la posible heterogeneidad y reducir la función efectora de Fc y aumentar la potencia.

Para reducir adicionalmente la heterogeneidad de la región de GDF15, en lugar de sustituir la asparagina en la posición 3 con aspartato, se sustituyó a la asparagina con glutamina. Además, las moléculas se diseñaron para que tuviesen dos cambios introducidos en el extremo N-terminal de GDF15, por ejemplo, GDF15(Δ 3/D5E) (SEQ ID NO: 17), GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 18) para eliminar la elevada tasa de desamidación e isomerización de la proteína GDF15 natural. Para reducir la función efectora de Fc y mejorar la potencia, las moléculas también se diseñaron para que tuviesen la región de bisagra de la

región de Fc delecionada adicionalmente teniendo seis aminoácidos adicionales delecionados de la región de bisagra de Fc (por ejemplo, FcΔ16 en lugar de FcΔ10), para reducir la unión a FcγR. Se realizó el mismo diseño de la región de bisagra para las correspondientes moléculas de Fc con las que heterodimerizan las proteínas de fusión GDF15-Fc.

La actividad de las proteínas de fusión GDF15-Fc diseñadas adicionalmente, FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E) (SEQ ID NO: 45), FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 46) y FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 47), se probó en monos cinomolgos. Los monos cinomolgos macho espontáneamente obesos que no se habían expuesto previamente se adaptaron/fueron entrenados para las manipulaciones del procedimiento (por ejemplo, extracción de sangre, inyección subcutánea, medición del peso corporal, pautas de alimentación) durante 10 semanas antes del comienzo del tratamiento. Se clasificaron ochenta (80) monos en 8 grupos de tratamiento de n=10 monos cada uno basándose en los datos recolectados durante la fase de adaptación/entrenamiento (química de la sangre y peso corporal). A cada grupo de tratamiento se le administró vehículo, 3 mg/kg del control positivo FGF21-Fc, 0.5 mg/kg de FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K,CC) (SEQ ID NO: 35)), 3.0 mg/kg de FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K,CC) (SEQ ID NO: 35)), 0.5 mg/kg de FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K,CC)), 3.0 mg/kg de FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K,CC)), 0.5 mg/kg de FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 36)), o 3.0 mg/kg de FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K) (SEQ ID NO: 36)). Se dieron inyecciones subcutáneas de cada uno una vez a la semana durante 4 semanas durante la fase de tratamiento, seguido por una fase de reposo farmacológico de 4 semanas; la extracción de sangre y el control de peso corporal tuvo lugar semanalmente y la ingesta de alimento tuvo lugar diariamente durante las fases de tratamiento y de reposo farmacológico. El gráfico representa n=5-6/grupo y los datos se representan como la media del grupo $\pm$ EEM. Se realizó un análisis estadístico mediante ANCOVA y la significación estadística se denotó como $p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ frente al vehículo. Se sospechó que los monos con una tasa rápida de eliminación del fármaco tenían anticuerpos antifármaco (ADA) y se excluyeron del análisis.

De manera inesperada, las proteínas de fusión GDF15-Fc recién diseñadas perdieron casi toda la potencia (**Figura 7**). Ninguna de las proteínas de fusión GDF15-Fc recién diseñadas redujo el peso corporal en un grado parecedido a la FGF21-Fc, al contrario de las proteínas de fusión GDF15-Fc generadas previamente (véase el Ejemplo 1, **Figura 1**).

Ejemplo 5: Restauración de la actividad de la proteína de fusión GDF15-Fc en monos cinomolgos

Las proteínas de fusión GDF15-Fc en el Ejemplo 4 en comparación con la proteína de fusión GDF15-Fc en el Ejemplo 1 tenían las siguientes diferencias tal como se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7: Diferencias entre las proteínas de fusión GDF15-Fc en los Ejemplo 1 y 4

Moléculas GDF15-Fc en el Ejemplo 1:	Moléculas GDF15-Fc en el Ejemplo 5: Sin
Eficacia en monos cinomolgos	eficacia en monos cinomolgos
Δ10 en región de Fc	Δ16 en región de Fc
Sin pinzamiento de cisteína	Pinzamiento de cisteína
Tiene enlazador	No tiene enlazador
GDF15 de tipo silvestre	Dos mutaciones en el extremo N-terminal de GDF15

Para restaurar la potencia, se reintrodujeron diferentes aspectos de las moléculas que fueron eficaces en los monos en nuevas proteínas de fusión GDF15-Fc. El pinzamiento de cisteína (enlace disulfuro intercatenario de CH3) se eliminó y se reintrodujo un enlazador para FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) (SEQ ID NO: 49); FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 50) y FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 54). Sin embargo, el enlazador usado en este Ejemplo no se puede glucosilar (por ejemplo, G4Q) o era más corto (G4S en lugar de (G4S)4) para reducir la glucosilación. También, para FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), se eliminó la mutación en la posición 5. Por último, para la nueva molécula FcΔ10(-),L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 57), se reintrodujo la delección más pequeña de la region de bisagra de la Fc, sin embargo, con las mutaciones L234A/L235A en la región de Fc, lo que debería de eliminar la unión de FcγR.

Estas nuevas molécula de Fcs se compararon con la FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, la cual demostró ser eficaz en monos cinomolgos en el Ejemplo 1. Los monos cinomolgos macho espontáneamente obesos que no se habían expuesto previamente se adaptaron/fueron entrenados para las manipulaciones del procedimiento (por ejemplo, extracción de sangre, inyección subcutánea, medición del peso corporal, pautas de alimentación) durante 2 semanas antes del comienzo del tratamiento. Cuarenta y dos (42) monos se clasificaron en 6 grupos de tratamiento de n=7 monos cada uno basándose en los datos recogidos durante la fase de adaptación/entrenamiento (química de la sangre y peso corporal). A cada grupo de tratamiento se le administró vehículo, 1.5 mg/kg de FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ10(+,K)), 1.5 mg/kg de FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K)), 1.5 mg/kg de FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K)), 1.5 mg/kg de

FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ16(+,K)), o 1.5 mg/kg de FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (junto con su compañero de heterodimerización, FcΔ10(+,K,L234A/L235A) (SEQ ID NO: 37). Se dieron inyecciones subcutáneas una vez a la semana durante 2 semanas durante la fase de tratamiento; la extracción de sangre y el control del peso corporal tuvieron lugar semanalmente y la ingesta de alimento se controló diariamente durante la fase de tratamiento. El gráfico representa n=7/grupo y los datos se representan como la media del grupo $\pm$ EEM. Se realizó un análisis estadístico mediante ANCOVA y la significación estadística se denotó como $p<0.05$, $**p<0.01$ y $***p<0.001$ frente al vehículo. Las nuevas molécula de Fcs restauraron la potencia (**Figura 8**).

Basándose en estos resultados, se determinó que la mutación N3Q no afecta a la actividad de GDF15 en los monos, y que la doble mutación en GDF15 (N3Q/D5E) tampoco afectó a la actividad de GDF15 en los monos. La delección de 16 aminoácidos en la bisagra de Fc (Δ16) también demostró tener un efecto similar al de la delección de 10 aminoácidos en la bisagra de Fc (Δ10) en los monos. Por último, el enlazador demostró ser un componente crítico para la actividad en los monos. Aunque no afecta a la actividad si el enlazador es G4S o G4Q, la longitud del enlazador es importante para la actividad. Los enlazadores más largos (por ejemplo, (G4S)4 y (G4Q)4 en la **Figura 8**) son más potentes en comparación con un enlazador más corto (por ejemplo, G4S).

Ejemplo 6: Ensayo de ingesta de alimento en ratones ob/ob para FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) y FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)

Se usó un ensayo de ingesta de alimento para evaluar la eficacia de dos proteínas de fusión GDF15-Fc diferentes. Los ratones ob/ob macho de siete a ocho semanas de vida en jaulas individuales se clasificaron en diferentes grupos de tratamiento (n=5 por grupo) teniendo cada grupo niveles comparables de peso corporal y de ingesta de alimentos antes del tratamiento. A los animales se les trató con 0.32 ug/kg, 1.6 ug/kg, 8 ug/kg, 40 ug/kg, 0.2 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg del heterodímero FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ16(+,K) o FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ10(+,K,L234A/L235A) a través de inyección subcutánea y se midió la ingesta de alimento durante toda la noche. Los resultados de un experimento representativo para cada proteína de fusión GDF15-Fc se muestran en una curva de respuesta a la dosis para FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (**Figura 9**) y FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (**Figura 10**). Los resultados muestran que ambas proteínas de fusión GDF15-Fc reducen la ingesta de alimento en ratones ob/ob agudos. La DE50 en este ensayo se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: DE50 en ensayo de ingesta de alimento

Molécula	DE50 (mg/kg) n=3-5
FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)	7.4 ±4.2
FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)	5.8 ±0.7

Aunque la presente invención ha sido descrita en términos de varias realizaciones, se entiende que los expertos en la técnica pensarán en variaciones y mejoras. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas las variaciones equivalentes que están dentro del alcance de la invención como se reivindica. Además, los títulos de las secciones que se usan en la presente tienen únicamente fines de organización y no se debe interpretar como que limitan la materia descrita.

Todas las referencias citadas en la presente solicitud se incorporan expresamente a modo de referencia en el presente documento para cualquier fin.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.