

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 491**

51 Int. Cl.:

C07K 14/495 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2009 PCT/US2009/006252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10062383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2009 E 09761055 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2370463**

54 Título: **Una variante estabilizada de receptor IIB de activina**

30 Prioridad:

26.11.2008 US 200250 P
06.11.2009 US 259060 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2017

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

SUN, JEONGHOON;
TAM, LEI-TING TONY;
MICHAELS, MARK LEO;
BOONE, THOMAS C.;
DESHPANDE, ROHINI;
LI, YUE-SHENG y
HAN, HQ

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 600 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Una variante estabilizada de receptor IIB de activina

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 61/200.250, presentada el 26 de noviembre de 2008 y la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 61/259.060, presentada el 6 de noviembre de 2009.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

10 El campo técnico de esta invención se refiere a miembros de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y a receptores de TGF- β solubles con propiedades mejoradas, así como a métodos de modulación de las actividades de los miembros de la familia de TGF- β para el tratamiento de diversos trastornos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La familia de proteínas del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) incluye factores de crecimiento transformantes β (TGF- β), activinas, proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factores de crecimiento/diferenciación (GDF). Estos miembros de la familia están implicados en la regulación de un amplio intervalo de procesos biológicos incluyendo proliferación, diferenciación y otras funciones celulares.

20 El factor de crecimiento/diferenciación 8 (GDF-8), al que se hace referencia también como miostatina, es un miembro de la familia de TGF- β expresado en su mayor parte en las células de tejido muscular esquelético en desarrollo y adulto. La miostatina parece desempeñar un papel esencial en el control negativo del crecimiento de músculo esquelético (McPherron *et al.*, Nature (London) 387, 83-90 (1997), Zimmers *et al.*, Science 296: 1486-1488 (2002)). Se ha mostrado que antagonizar la miostatina aumenta la masa de músculo magro en animales.

25 Otro miembro de la familia de proteínas de TGF- β es un factor de crecimiento/diferenciación relacionado, el factor de crecimiento/diferenciación 11 (GDF-11). El GDF-11 tiene aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia aminoacídica de la miostatina. El GDF-11 tiene un papel en el patrón axial de animales en desarrollo (Oh *et al.*, Genes Dev 11: 1812-26 (1997)) y parece desempeñar también un papel en el desarrollo y crecimiento de músculo esquelético.

30 Las activinas A, B y AB son los homodímeros y heterodímero, respectivamente, de dos cadenas polipeptídicas, β A y β B (Vale *et al.*, Nature 321, 776-779 (1986), Ling *et al.*, Nature 321, 779-782 (1986)). Las activinas se descubrieron originalmente como péptidos gonádicos implicados en la regulación de la síntesis de hormona estimulante de folículo, y se cree ahora que están implicadas en la regulación de una serie de actividades biológicas. La activina A es una forma predominante de la activina.

35 La activina, miostatina, GDF-11 y otros miembros de la superfamilia de TGF- β se unen a y señalizan a través de una combinación de receptores de tipo II de activina y de tipo IIB de activina, siendo ambos serina/treonina cinasas transmembranales (Harrison *et al.*, J. Biol. Chem. 279, 28036-28044 (2004)). Los estudios de reticulación han determinado que la miostatina es capaz de unirse a los receptores de tipo II de activina ActRIIA y ActRIIB *in vitro* (Lee *et al.*, PNAS USA 98: 9306-11 (2001)). Existen también pruebas de que el GDF-11 se une tanto a ActRIIA como a ActRIIB (Oh *et al.*, Genes Dev 16: 2749-54 (2002)).

40 La expresión de proteína TGF- β es conocida por estar asociada a una variedad de enfermedades y trastornos. Por lo tanto, las moléculas terapéuticas capaces de antagonizar varias proteínas TGF- β simultáneamente pueden ser particularmente eficaces para tratar estas enfermedades y trastornos.

45 El documento WO 2008/109167 A da a conocer polipéptidos y proteínas receptores solubles IIB de activina variantes capaces de unirse a e inhibir las actividades de activina A, miostatina o GDF-11, que comprenden sustituciones en la posición 28, 40 y/o 64 (con respecto a la SEQ ID NO: 2 de la presente divulgación) y usos de los mismos. El documento WO 2008/097541 A da a conocer polipéptidos receptores solubles IIB de activina y métodos para tratar enfermedades asociadas a una actividad anormal de una proteína y/o ligando IIB de activina. Los polipéptidos comprenden motivos N-X-S/T.

50 La producción de proteínas terapéuticas a escala comercial requiere proteínas que puedan expresarse y purificarse eficazmente sin desestabilización de la integridad de la proteína. La fabricabilidad puede describirse como la capacidad de expresar y purificar una proteína de manera suficientemente eficaz para permitir una producción económica de la proteína. En un entorno comercial, la fabricabilidad debe determinarse para cada proteína terapéutica potencial. Aunque los procesos de expresión y purificación de proteína pueden optimizarse para una proteína, la fabricabilidad parece ser función de las propiedades intrínsecas de la proteína también. La presente invención proporciona proteínas terapéuticas biológicamente activas que tienen propiedades de fabricabilidad mejoradas, capaces de antagonizar eficazmente proteínas TGF- β .

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona proteínas aisladas que comprenden polipéptidos receptores IIB de activina humana estabilizados (designados svActRIIB) capaces de unirse a e inhibir las actividades de activina, GDF-11 y miostatina, y caracterizadas por propiedades de fabricabilidad mejoradas. Los polipéptidos ActRIIB estabilizados se caracterizan por tener sustituciones aminoacídicas en ambas posiciones 28 y 44 con respecto a la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína aislada comprende un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y, y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y, y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y, y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene una secuencia aminoacídica con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con cualquiera de los polipéptidos anteriores, en la que el polipéptido tiene una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, la sustitución de los polipéptidos anteriores en la posición 28 es W, y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En otra realización, la proteína aislada comprende un polipéptido receptor IIB de activina estabilizado, en la que el polipéptido tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 12 o 14, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 12 o 14, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización adicional, la proteína svActRIIB comprende además una proteína heteróloga. En una realización, la proteína heteróloga es un dominio Fc. En una realización adicional, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana. En una realización adicional, la proteína heteróloga está enlazada por un péptido ligador o ligador de bisagra. En una realización, el ligador o ligador de bisagra se selecciona del grupo consistente en las secuencias aminoacídicas expuestas en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 25, 27, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49 y 50. En una realización adicional, los ligadores de bisagra expuestos en las SEQ ID NO: 27, 38, 40, 42, 44, 45 o 46 ligan el Fc de IgG2 humano (SEQ ID NO: 22) con un polipéptido svActRIIB. En otra realización, los ligadores de bisagra expuestos en las SEQ ID NO: 48, 49 o 50 ligan el Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO: 23) o el Fc de IgG1 modificado (SEQ ID NO: 47) con un polipéptido svActRIIB.

En una realización adicional, la proteína comprende un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 8, 10, 16 o 18, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 8, 10, 16 o 18, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización adicional, la sustitución de los polipéptidos anteriores en la posición 28 es W, y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización adicional, la proteína comprende un polipéptido enumerado anteriormente, en la que el residuo aminoacídico en posición 64 es alanina.

La invención proporciona también una proteína aislada consistente en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido ActRIIB estabilizado. En una realización, el polinucleótido codifica la secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica el polipéptido que tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica el polipéptido que tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y, y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica el polipéptido que tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con uno cualquiera de los polipéptidos anteriores, en la que el polipéptido tiene una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, los polinucleótidos anteriores codifican un polipéptido en el que la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, en los que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 12 o 14, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 12 o 14, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, los polinucleótidos anteriores codifican un polipéptido en el que la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, en los que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 3, 5, 11 y 13 o su complemento.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido expuesto anteriormente, y comprende además un polinucleótido que codifica al menos una proteína heteróloga. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 8, 10, 16 o 18, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 8, 10, 16 o 18, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, los polinucleótidos anteriores codifican un polipéptido en el que la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición S44 es T, en los que el polipéptido codificado es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 7, 9, 15 y 17 o su complemento.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende además polinucleótidos que codifican los ligadores y ligadores de bisagra expuestos en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 25, 27, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49 y 50.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico comprende además una secuencia reguladora transcripcional o traduccional. En otro aspecto, se proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una proteína o polipéptido ActRIIB estabilizado de la invención. En otra realización, se proporcionan células hospedadoras que comprenden los vectores recombinantes de la invención, y se proporcionan métodos de producción de las proteínas y polipéptidos ActRIIB estabilizados de la invención mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que promuevan la expresión de las proteínas o polipéptidos, y la recuperación de la proteína.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido o proteína ActRIIB estabilizado de la presente invención en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, y el uso de la composición farmacéutica como medicamento.

Se describe también en la presente memoria dicha composición para uso en un método de inhibición de la actividad de miostatina o activina en un sujeto necesitado de dicho tratamiento.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de dicha composición en un método de aumento de la masa de músculo magro o de aumento de la relación de masa de músculo magro a masa grasa en un sujeto necesitado de dicho tratamiento, en el que el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

En otro aspecto, la invención proporciona dicha composición para uso en un método de tratamiento o prevención de consunción muscular o un trastorno metabólico seleccionado de diabetes, obesidad, hiperglicemia y pérdida ósea en un sujeto necesitado de dicho tratamiento. La consunción muscular puede ser debida a una enfermedad seleccionada, pero sin limitación, de las siguientes afecciones: caquexia por cáncer, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca crónica, caquexia química, caquexia por VIH/SIDA, insuficiencia renal, uremia, artritis reumatoide, sarcopenia relacionada con la edad, debilidad relacionada con la edad, atrofia orgánica, síndrome del túnel carpiano, privación de andrógenos y consunción muscular debida a inactividad por reposo en cama prolongado, lesión de médula espinal, apoplejía, fractura ósea, quemaduras, envejecimiento, resistencia a insulina y otros trastornos. La consunción muscular puede ser también el resultado de la ingravidez debida al vuelo espacial.

En otro aspecto, la presente invención proporciona dicha composición para uso en un método de tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa activina en un sujeto necesitado de dicho tratamiento. En otro aspecto, la presente invención proporciona dicha composición para uso en un método de tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto necesitado de dicho tratamiento, en el que el trastorno metabólico se selecciona de pérdida ósea, diabetes, obesidad e hiperglicemia. En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que codifica un polipéptido o proteína svActRIIB de la presente invención para uso en un método de terapia génica para tratar consunción muscular o trastornos metabólicos o relacionados con la activina como se describen anteriormente, en el que el vector es capaz de expresar la proteína o polipéptido svActRIIB en el sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una comparación entre ActRIIB-Fc (E28W) y svActRIIB-Fc (E28W, S44T) en una columna de SEC. svActRIIB-Fc (E28W, S44T) muestra un solo pico en comparación con ActRIIB-Fc (E28W), que muestra tres picos.

La Figura 2 muestra el aumento de masa corporal durante un periodo de 14 días en 10 ratones C57Bl/6 administrados con una sola dosis de 10 mg/kg de svActRIIB-Fc (E28W, S44T), en comparación con 10 ratones administrados con 10 mg/kg de PBS.

La Figura 3 muestra el cambio relacionado con la dosis de la masa corporal magra con el tiempo para C57Bl/6 receptores de una sola dosis de 0,3 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg de svActRIIB-Fc (E28W, S44T).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor IIB de activina humana estabilizado (svActRIIB). La proteína y polipéptido de la invención se caracterizan por su capacidad de unirse a al menos una de las tres proteínas TGF- β , miostatina (GDF-8), activina A o GDF-11, para inhibir las actividades de al menos una de estas proteínas, y por tener propiedades de fabricabilidad mejoradas en comparación con otros receptores solubles ActRIIB. El polipéptido receptor IIB de activina humana estabilizado se caracteriza por sustituciones aminoacídicas en ambas posiciones E28 y S44 con referencia al dominio extracelular de ActRIIB, como se expone en la SEQ ID NO: 2. En una realización, un polipéptido receptor IIB de activina humana estabilizado puede tener una sustitución adicional de alanina en posición 64 con respecto a la SEQ ID NO: 2.

Como se usa en la presente memoria, el término "miembros de la familia de TGF- β " o "proteínas TGF- β " hace referencia a los factores de crecimiento estructuralmente relacionados de la familia del factor de crecimiento transformante, incluyendo activinas y proteínas de factor de crecimiento y diferenciación (GDF) (Kingsley *et al.* Genes Dev. 8: 133-146 (1994), McPherron *et al.*, "Growth factors and cytokines in health and disease", vol. 1B, D. LeRoith y C. Bondy. ed., JAI Press Inc., Greenwich, Conn, EE.UU.: pág 357-393).

El GDF-8, al que se hace referencia también como miostatina, es un regulador negativo del tejido de músculo esquelético (McPherron *et al.* PNAS USA 94: 12457-12461 (1997)). La miostatina se sintetiza como una proteína inactiva de aproximadamente 375 aminoácidos de longitud, que tiene el nº de acceso a GenBank AAB86694 (SEQ ID NO: 35) para ser humano. La proteína precursora se activa mediante escisión proteolítica en un sitio de procesamiento tetrabásico, produciendo un prodominio inactivo N-terminal y una proteína C-terminal de aproximadamente 109 aminoácidos que dimeriza, formando un homodímero de aproximadamente 25 kDa. Este homodímero es la proteína biológicamente activa madura (Zimmers *et al.*, Science 296, 1486 (2002)).

Como se usa en la presente memoria, el término "prodominio" o "propéptido" hace referencia a la proteína N-terminal inactiva que se escinde para liberar la proteína C-terminal activa. Como se usa en la presente memoria, el término "miostatina" o "miostatina madura" hace referencia al polipéptido C-terminal biológicamente activo maduro en forma monomérica, dimérica u otra, así como a fragmentos biológicamente activos o polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de corte y empalme y péptidos y polipéptidos de fusión. Se ha reseñado que la miostatina madura tiene un 100 % de identidad de secuencia entre muchas especies, incluyendo ser humano, ratón, pollo, porcino, pavo y rata (Lee *et al.*, PNAS 98, 9306 (2001)).

Como se usa en la presente memoria, GDF-11 hace referencia a BMP (proteína morfogénica ósea) que tiene el número de acceso a Swissprot 095390 (SEQ ID NO: 36), así como a variantes y homólogos de especie de esa proteína. El GDF-11 está implicado en la regulación de los patrones anterior/posterior del esqueleto axial (McPherron *et al.*, Nature Genet. 22 (93): 260-264 (1999); Gamer *et al.*, Dev. Biol. 208 (1), 222-232 (1999)) pero las funciones postnatales son desconocidas.

La activina A es el homodímero de las cadenas polipeptídicas β A. Como se usa en la presente memoria, el término "activina A" hace referencia a la proteína activina que tiene el nº de acceso a GenBank: NM_002192 (SEQ ID NO: 34). Las activinas A, B y AB son los homodímeros y heterodímero, respectivamente, de las dos cadenas polipeptídicas β A and β B. Como se usa en la presente memoria, "activina" hace referencia a la activina A, B y AB, así como variantes y homólogos de especie de esa proteína.

Polipéptidos receptores

Como se usa en la presente memoria, el término receptores de tipo IIB de activina (ActRIIB) hace referencia a receptores de activina humana que tienen el número de acceso NP_001097 o variantes de los mismos, tales como aquellos que tienen la arginina en posición 64 sustituida por alanina. El término ActRIIB soluble (tipo silvestre) hace referencia al dominio extracelular de ActRIIB, aminoácidos 1 a 134 (con secuencia señal), o a los aminoácidos 19 a 134 de SEQ ID NO: 2 (sin secuencia señal).

Polipéptidos receptores estabilizados

La presente invención proporciona una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor ActRIIB estabilizado (al que se hace referencia en la presente memoria como "polipéptido svActRIIB"). Como se usa en la presente memoria, el término "proteína svActRIIB" hace referencia a una proteína que comprende un polipéptido ActRIIB estabilizado. Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" hace referencia a una molécula de proteína o polipéptido purificada en cierto grado desde el material endógeno. Estos polipéptidos y proteínas se caracterizan por tener la capacidad de unirse a e inhibir la actividad de una cualquiera de activina A, miostatina o GDF-11, además de tener características de fabricabilidad mejoradas.

El polipéptido ActRIIB estabilizado se caracteriza por tener una sustitución aminoacídica en ambas posiciones 28 y 44 con respecto a la SEQ ID NO: 2. Por consistencia, se hace referencia siempre a las posiciones aminoacídicas en los polipéptidos y proteínas ActRIIB estabilizados con respecto a las posiciones en la SEQ ID NO: 2, independientemente de si el polipéptido es maduro o truncado. Como se usa en la presente memoria, "maduro" hace referencia a un polipéptido o péptido sin su secuencia señal. Como se usa en la presente memoria, el término "truncado" hace referencia a polipéptidos que tienen aminoácidos N-terminales o aminoácidos C-terminales eliminados.

En una realización, el polipéptido receptor IIB de activina (svActRIIB) estabilizado aislado tiene la secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polipéptido tiene una secuencia aminoacídica con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

98 % o 99 % de identidad con uno cualquiera de los polipéptidos anteriores, en el que el polipéptido tiene una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en el que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T, y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, la sustitución de los polipéptidos anteriores en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización, el polipéptido svActRIIB incluye una secuencia señal, por ejemplo las SEQ ID NO: 4, 8, 12 y 16. Sin embargo, pueden usarse diversos péptidos señal en la preparación de los polipéptidos de la presente solicitud. Los péptidos señal pueden tener la secuencia expuesta en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID NO: 4, por ejemplo, o las secuencias señal expuestas en las SEQ ID NO: 31 y 32. Puede usarse cualquier otro péptido señal útil para expresar polipéptidos svActRIIB. En otras realizaciones, la secuencia señal se retira, dejando el péptido maduro. Los ejemplos de polipéptidos svActRIIB que carecen de una secuencia señal incluyen, por ejemplo, las SEQ ID NO: 6, 10, 14 y 18.

En una realización, la proteína comprende un polipéptido receptor IIB de activina estabilizado, en el que el polipéptido se selecciona del grupo consistente en polipéptidos que tienen la secuencia expuesta en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14. Estos polipéptidos representan los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, en los que el polipéptido tiene una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en los que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T, y en los que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11, con y sin una secuencia señal diferente de la mostrada en la SEQ ID NO: 2. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 12 o 14, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición 28 y T en la posición 44, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, la sustitución en la posición 28 es W, y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización adicional, la proteína svActRIIB comprende además una proteína heteróloga. En una realización, la proteína heteróloga es un dominio Fc. En una realización adicional, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana. En una realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 8, 10, 16 o 18, en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición 28 y T en la posición 44, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización adicional, la proteína comprende uno cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente, en la que el residuo aminoacídico en posición 64 es alanina.

En otra realización, el término polipéptido y proteína svActRIIB engloba proteínas que comprenden fragmentos de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 12 y 14, incluyendo truncamientos N- y C-terminales, en las que la posición 28 es W y la posición 44 es T, y en las que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

Como se usa en la presente memoria, el término "derivado" del polipéptido svActRIIB hace referencia al enlazamiento de al menos un resto químico adicional, o al menos un polipéptido adicional, formando conjugados covalentes o agregados tales como grupos glicosilo, lípidos, grupos acetilo o polipéptidos de fusión C-terminales o N-terminales, conjugación con moléculas de PEG y otras modificaciones que se describen con más detalle a continuación. Los polipéptidos receptores ActRIIB estabilizados pueden incluir también modificaciones y derivados adicionales, incluyendo modificaciones de los extremos C y N que surgen del procesamiento debido a la expresión en diversos tipos celulares tales como células de mamífero, *E. coli*, levaduras y otras células hospedadoras recombinantes.

Las proteínas svActRIIB de la presente invención pueden comprender además polipéptidos heterólogos enlazados con el polipéptido svActRIIB directamente o mediante una secuencia ligadora, formando una proteína de fusión. Como se usa en la presente memoria, el término "proteína de fusión" hace referencia a una proteína que tiene un polipéptido heterólogo enlazado mediante técnicas de ADN recombinante. Los polipéptidos heterólogos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos Fc, marcadores His y dominios de cremallera de leucina para promover la oligomerización y estabilización adicional de los polipéptidos ActRIIB estabilizados como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/29581. En una realización, el polipéptido heterólogo es un polipéptido o dominio Fc. En una realización, el dominio Fc se selecciona de un dominio Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 23), Fc de IgG1 modificado (SEQ ID NO: 47), Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 22) y Fc de IgG4 (SEQ ID NO: 24). La proteína svActRIIB puede comprender además toda o una porción de la secuencia bisagra de IgG1 (SEQ ID NO: 29), IgG2 (SEQ ID NO: 28) o IgG4 (SEQ ID NO: 30). Los polipéptidos svActRIIB ejemplares se seleccionan de polipéptidos consistentes en las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18, así como aquellos polipéptidos que tienen una similitud sustancial con estas secuencias, en los que se retienen las sustituciones en posiciones 28 y 44. Como se usa en la presente memoria, "similitud sustancial" hace referencia a secuencias que son al menos un 90 % idénticas, 95 %

idénticas, 96 % idénticas, 97 % idénticas, 98 % idénticas o 99 % idénticas a cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18, y en las que los polipéptidos retienen W o Y en la posición 28 y T en la posición 44, y en las que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, la sustitución en la posición 28 es W, y la sustitución en la posición 44 es T, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

5 El polipéptido svActRIIB puede comprender opcionalmente además una secuencia "ligadora". Los ligadores sirven principalmente como espaciador entre un polipéptido y un segundo polipéptido heterólogo u otro tipo de fusión o entre dos o más polipéptidos de ActRIIB estabilizados. En una realización, el ligador está compuesto por aminoácidos ligados entre sí por enlaces peptídicos, preferiblemente de 1 a 20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos de origen natural. Uno o más de estos
10 aminoácidos puede estar glicosilado, como se entiende por los especialistas en la materia. En una realización, los 1 a 20 aminoácidos pueden seleccionarse de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En una realización, un ligador está compuesto por una mayoría de aminoácidos que están estéricamente no impedidos, tales como glicina y alanina. Son ligadores ejemplares poliglicinas (particularmente (Gly)₅, (Gly)₈, poli(Gly-Ala) y polialaninas. Es un ligador adecuado ejemplar como se muestra en los ejemplos siguientes (Gly)₄Ser (SEQ ID NO: 25). En una realización adicional, svActRIIB puede comprender un "ligador de bisagra", que es una secuencia ligadora proporcionada adyacente a una región de bisagra o una región de bisagra parcial de una IgG, como se ejemplifica en la SEQ ID NO: 27. Las secuencias de bisagra incluyen IgG2Fc (SEQ ID NO: 28), IgG1Fc (SEQ ID NO: 29) e IgG4Fc (SEQ ID NO: 30).

Las secuencias ligadoras de bisagra pueden diseñarse también para mejorar la fabricabilidad y estabilidad de las proteínas svActRIIB-Fc. En una realización, se diseñan los ligadores de bisagra de SEQ ID NO: 27, 38, 40, 42, 44, 45 y 46 para mejorar la fabricabilidad con el Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 22) cuando se enlaza con polipéptidos svActRIIB. En una realización, se diseñan las secuencias ligadoras de bisagra para mejorar la fabricabilidad cuando se enlazan polipéptidos svActRIIB con un Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 23) o un Fc de IgG1 modificado (SEQ ID NO: 47), por ejemplo, los ligadores de bisagra que tienen las SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50. Se describe a continuación en el Ejemplo 4 la fabricabilidad mejorada de estos polipéptidos.
20
25

Los ligadores pueden ser también ligadores no peptídicos. Por ejemplo, pueden usarse ligadores alquilo tales como -NH-(CH₂)_s-C(O)-, en la que s = 2-20. Estos ligadores alquilo pueden sustituirse además con cualquier grupo sin impedimento estérico tal como alquilo inferior (p.ej., C₁-C₆), acilo inferior, halógeno (p.ej., Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc.

Los polipéptidos svActRIIB dados a conocer en la presente memoria pueden enlazarse también con una molécula no polipeptídica con el fin de conferir propiedades deseadas tales como reducir la degradación y/o aumentar la semivida, reducir la toxicidad, reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la actividad biológica de los polipéptidos svActRIIB. Las moléculas ejemplares incluyen, pero sin limitación, polímeros lineales tales como polietilenglicol (PEG), polilisina, un dextrano; un lípido; un grupo colesterol (tal como un esteroide); un carbohidrato o una molécula de oligosacárido.
30

Las proteínas y polipéptidos svActRIIB tienen propiedades de fabricabilidad mejoradas cuando se comparan con otros polipéptidos ActRIIB solubles. Como se usa en la presente memoria, el término "fabricabilidad" hace referencia a la estabilidad de una proteína particular durante la expresión recombinante y purificación de esa proteína. Se cree que la fabricabilidad es debida a las propiedades intrínsecas de la molécula en condiciones de expresión y purificación. Se exponen ejemplos de características de fabricabilidad mejoradas en los Ejemplos siguientes, e incluyen glicosilación uniforme de una proteína (Ejemplo 2), título celular, crecimiento y expresión de proteína aumentados durante la producción recombinante de la proteína (Ejemplo 1), propiedades de purificación mejoradas (Ejemplo 2) y estabilidad mejorada a bajo pH (Ejemplo 2). Las proteínas y polipéptidos svActRIIB de la presente invención demuestran una fabricabilidad mejorada, junto con la retención de la actividad *in vitro* e *in vivo* (Ejemplos 2 y 3), en comparación con otros polipéptidos ActRIIB solubles. Además, secuencias ligadoras de bisagra adicionales pueden conferir beneficios de fabricabilidad adicionales, como se muestra en el Ejemplo 4 siguiente.
35
40
45

Como se usa en la presente memoria, el término "actividad del polipéptido svActRIIB" o "una actividad biológica de un polipéptido ActRIIB soluble" hace referencia a una o más actividades *in vitro* o *in vivo* de los polipéptidos svActRIIB incluyendo, pero sin limitación, aquellas demostradas en el ejemplo siguiente. Las actividades de los polipéptidos svActRIIB incluyen, pero sin limitación, la capacidad de unirse a miostatina o activina A o GDF-11 y la capacidad de inhibir o neutralizar una actividad de miostatina o activina A o GDF-11. Como se usa en la presente memoria, el término "capaz de unirse" a miostatina, activina A o GDF-11 hace referencia a la unión medida mediante métodos conocidos en la materia, tales como el método KinExA™ mostrado en los ejemplos siguientes. La inhibición *in vitro* de miostatina, activina A o GDF-11 puede medirse usando, por ejemplo, el ensayo pMARE basado en células C2C12 descrito en los Ejemplos siguientes. La actividad *in vivo*, demostrada en el Ejemplo 3 siguiente, se demuestra por una masa de músculo magro aumentada en modelos de ratón. Las actividades *in vivo* de los polipéptidos y proteínas svActRIIB incluyen, pero sin limitación, aumentar el peso corporal, aumentar la masa de músculo magro y aumentar la relación de músculo magro a masa grasa. Las actividades terapéuticas incluyen además reducir o prevenir la caquexia causada por ciertos tipos de tumores, prevenir el crecimiento de ciertos tipos de tumores y aumentar la supervivencia de ciertos modelos animales. Se proporciona a continuación una discusión adicional de las actividades de proteína y polipéptido svActRIIB.
50
55
60

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido svActRIIB de la presente invención. Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" hace referencia a moléculas de ácido nucleico purificadas en cierto grado desde el material endógeno.

5 En una realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en el que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en el que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en el que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en el que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T. En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con uno cualquiera de los polipéptidos anteriores, en el que el polipéptido tiene una sola sustitución aminoacídica en la posición 28 y una sola sustitución aminoacídica en la posición 44, en el que la sustitución en la posición 28 se selecciona de W o Y y la sustitución en la posición 44 es T, y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, el polinucleótido de las realizaciones anteriores codifica un polipéptido en el que la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T.

En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14. En otra realización, el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 12 o 14, en el que el polipéptido tiene W o Y en la posición 28 y T en la posición 44, y en el que el polipéptido es capaz de unirse a activina A, GDF-11 o miostatina. En una realización, el polinucleótido de las realizaciones anteriores codifica un polipéptido en el que la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, y en el que el polipéptido es capaz de unirse a activina A, GDF-11 o miostatina.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende además un polinucleótido que codifica al menos una proteína heteróloga. En una realización, la proteína heteróloga es un dominio Fc, en una realización adicional, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende además polinucleótidos que codifican los ligadores y ligadores de bisagra expuestos en las SEQ ID NO: 25, 27, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49 o 50. En una realización adicional, dichos polinucleótidos tienen secuencias seleccionadas del grupo consistente en las SEQ ID NO: 26, 37, 39, 41 y 43.

En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido consistente en la secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18. En otra realización, el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18, en el que el polipéptido tiene W o Y en la posición 28 y T en la posición 44, y en el que el polipéptido es capaz de unirse a activina A, GDF-11 o miostatina. En una realización, el polinucleótido de las realizaciones anteriores codifica un polipéptido en el que la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que tiene la secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 3, 5, 11 o 13 o su complemento. En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que tiene la secuencia seleccionada del grupo consistente en la secuencia de SEQ ID NO: 7, 9, 15 y 17 o su complemento.

50 Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ADN en forma tanto monocatenaria como bicatenaria, así como el complemento de ARN del mismo. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ADN amplificado por PCR y combinaciones de los mismos. El ADN genómico puede aislarse mediante técnicas convencionales, tales como usando el ADN de las SEQ ID NO: 3, 5, 11 o 13, o un fragmento adecuado del mismo, como sonda. El ADN genómico que codifica polipéptidos ActRIIB se obtiene a partir de colecciones genómicas que están disponibles para una serie de especies. El ADN sintético está disponible por síntesis química de fragmentos oligonucleotídicos superpuestos seguida del ensamblaje de los fragmentos para reconstituir parte o todas las regiones de codificación y secuencias flanqueantes. El ARN puede obtenerse de vectores de expresión procarióticos que dirigen la síntesis a alto nivel de ARNm, tales como vectores que usan los promotores T7 y ARN polimerasa. El ADNc se obtiene de colecciones preparadas a partir de ARNm aislado de diversos tejidos que expresan ActRIIB. Las moléculas de ADN de la invención incluyen genes completos así como polinucleótidos y fragmentos de los mismos. El gen completo puede incluir también secuencias que codifican la secuencia señal N-terminal.

La invención proporciona además la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente, en la que el polinucleótido está ligado operativamente con una secuencia reguladora transcripcional o traduccional.

Secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas ejemplares

svActRIIB (E28W, S44T) con secuencia señal

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgccttttaagaggtgccagtgtgagacacgggtggtgcatctactacaac
gccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagcaggacaagcggctgact
gctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggctgctggctagatgacttcaactgctacg
ataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgagggaacttctgcaacgagcgt
tcaactcatttccagaggctgggggcccgaagtacgtacgagccacccccgacagccccacc (SEQ ID NO:
3)

5

svActRIIB (E28W, S44T) con secuencia señal

mefglswvflvallrgvqcetrcwiynanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfn
cydrqecvateenpqvyfcccegnfncnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO: 4)

svActRIIB (E28W, S44T) sin secuencia señal

gagacacgggtggtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaag
ggcgagcaggacaagcggctgactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggc
tctgctgtagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgct
gtgagggaacttctgcaacgagcgttcaactcatttccagaggctgggggcccgaagtcacgtacgagccaccccc
gacagccccacc (SEQ ID NO: 5)

10

svActRIIB (E28W, S44T) sin secuencia señal

etrcwiynanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfc
ccegnfncnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO: 6)

secuencia polinucleotídica de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) con secuencia señal

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgccttttaagaggtgccagtgtgagacacgggtggtgcatctactacaac
gccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagcaggacaagcggctgact
gctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggctgctggctagatgacttcaactgctacg
ataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgagggaacttctgcaacgagcgt
tcaactcatttccagaggctgggggcccgaagtacgtacgagccacccccgacagccccaccggagggggaggat
ctgtcaggtgccaccgtgccagcaccactgtggcaggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacacc
ctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccacgaagaccccagggtccagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccacgggaggagcagttcaacgacagttccgtgtggtc
agcgtcctcaccgttgcaccagactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccag
ccccatcgagaaaaccatctccaaaacaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggg
aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggctctatcccagcagatcgccgtggagtgaggga
gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttctctctacagca
agctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
tacagcagaagagcctctccctgctccgggtaaa (SEQ ID NO: 7)

secuencia polipeptídica de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) con secuencia señal

mefglswvflvallrgvqcetrcwiynanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfn
cydrqecvateenpqvyfcccegnfncnerfthlpeaggpevtyeppptaptgggsvceppepappvagsvflfpp
kpkdltlmsrtpetvvcvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvlvtvvhqdwlngkeykc
kvsnkglpapiektisktkgpprepqvytlppsrecmtnkqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppml
dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO: 8)

15

secuencia polinucleotídica de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) sin secuencia señal

gagacacgggtggtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcgaa
ggcagcaggacaagcggctgactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggc
tgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagggtgacttctgctgct
gtgagggcaacttctgcaacgagcgttactcatttccagagggctggggcccgggaagtacgtacgagccaccccc
gacagccccaccggagggggaggatctgtcagtgcccaccgtgcccagaccactgtggcaggaccgtcagctctc
ctctcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagcca
cgaagacccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggagga
gcagttcaacagcacgttccgtgtgtcagcgtctcaccgttggcaccaggactggctgaacggcaaggagtaacaagt
gcaaggtctcaacaaaggcctccagccccatcgagaaaaaccatctccaaacaaagggcagccccgagaaccac
agggttacaccctgccccatccggggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaaaggctctat
cccagcgacatcccggtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggac
tccagcggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctcc
gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagacctctcctgctccgggtaa (SEQ ID NO: 9)

secuencia polipeptídica de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) sin secuencia señal

etrwciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncyrqecvateenpqvyfc
cccgnfncnerfthlpeaggpevtyeppptaptgggsvccppcpappvagsvflfppkpkdtlmsirtpcvvvd
vshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkg
qprepqvylppsreemtknqslclvkgfypsdiavewcsngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwq
qgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO: 10)

svActRIIB (E28Y, S44T) con secuencia señal

atggagtttgggctgagctgggtttctcgttctctttaagaggtgccagtgtagacacggactgcatctactacaac
gccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtcgcgaaggcgagcaggacaagcggctgact
gctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggctgctggctagatgacttcaactgctacg
ataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagggtgacttctgctgctgtagggcaacttctgcaacgagcgt
tcaactattgcccagaggctggggcccgggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccacc (SEQ ID NO:
11)

5

svActRIIB (E28Y, S44T) con secuencia señal

mcfglswvflvallrgvqcetryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfnc
yrqecvateenpqvyfcccegnfncnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO: 12)

svActRIIB (E28Y, S44T) sin secuencia señal

gagacacgggtactgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcgaa
ggcagcaggacaagcggctgactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggc
tgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagggtgacttctgctgct
gtgagggcaacttctgcaacgagcgttactcatttccagagggctggggcccgggaagtcacgtacgagccaccccc
gacagccccacc (SEQ ID NO: 13)

10

svActRIIB (E28Y, S44T) sin secuencia señal

etryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncyrqecvateenpqvyfc
cccgnfncnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO: 14)

secuencia polinucleotídica de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) con secuencia señal

atggagtttgggctgagctgggtttctcgttctctttaagaggtgccagtgtagacacggactgcatctactacaac
gccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtcgcgaaggcgagcaggacaagcggctgact
gctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggctgctggctagatgacttcaactgctacg
ataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagggtgacttctgctgctgtagggcaacttctgcaacgagcgt
tcaactattgcccagaggctggggcccgggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccaccggagggggaggat
ctgtcagtgcccaccgtgcccagcaccactgtggcaggaccgtcagcttctctctcccccaaaaccaaggacacc

ctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagacaagaccacgggagggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtc
agcgtctcaccgtgtgaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaggcctccag
ccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccggg
aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaaaggctctatcccagcgacatgcccgtggagtggga
gagcaatggcgagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgagggctccttctctctacagca
agctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccac
tacacgcagaagagcctctccctgtctccggtaaa (SEQ ID NO: 15)

secuencia polipeptídica de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) con secuencia señal

mefglswvflvllrgvqcetryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswmssgtielvkkgcwlddfnc
ydrqecvateenpqvyfccccgnfncrflhpcaggpvtycpptaptgggsvccppcpappvagsvflfppk
pkdtilmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykck
vsnkglpapiektskkgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmls
dgsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO: 16)

secuencia polinucleotídica de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) sin secuencia señal

gagacacggctactgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcgaa
ggcggagcaggacaagcggctgactgctacgctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggc
tgctggctagatgactcaactgctacgatagggcaggtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgct
gtgagggcaacttctgcaacgagcgttactcatttccagaggtggggcccggaagtcacgtacgagccaccccc
gacagccccaccggagggggaggtactgtcagtgccccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctc
ctctcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagcca
cgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccacgggagga
gcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagt
gcaaggtctccaacaaggcctccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaggcagccccgagaaccac
agggtgtacacctgccccatccgggagggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctat
cccagcgacatgcccgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacacctccatgctggac
tccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctcc
gtgatgcatgaggtctgcacaaccactacgcagaagacctctcctgtctccggtaaa (SEQ ID NO: 17)

5

secuencia polipeptídica de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) sin secuencia señal

etryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswmssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyf
ccccgnfncrflhpcaggpvtycpptaptgggsvccppcpappvagsvflfppkpkdtilmisrtpevtcvvvd
vshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektskkg
qprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmlsdgsfflyskltvdksrwq
gnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO: 18)

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan también vectores de expresión que contienen las moléculas de ácido nucleico y polinucleótidos de la presente invención, y se proporcionan también células hospedadoras transformadas con dichos vectores y métodos de producción de los polipéptidos svActRIIB. El término "vector de expresión" hace referencia a un plásmido, fago, virus o vector para expresar un polipéptido a partir de una secuencia polinucleotídica. Los vectores para la expresión de los polipéptidos svActRIIB contienen como mínimo las secuencias requeridas para la propagación del vector y la expresión del inserto clonado. Un vector de expresión comprende una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo promotores o potenciadores; (2) una secuencia que codifica polipéptidos y proteínas svActRIIB para transcribir en ARNm y traducir en proteína y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción apropiadas. Estas secuencias pueden incluir además un marcador de selección. Los vectores adecuados para expresión en células hospedadoras están fácilmente disponibles y las moléculas de ácido nucleico se insertan en los vectores usando técnicas de ADN recombinante estándares. Dichos vectores pueden incluir promotores que funcionan en tejidos específicos y vectores víricos para la expresión de polipéptidos svActRIIB en células diana humanas o animales. Es un vector de expresión ejemplar adecuado para expresión de svActRIIB el pDSRa, (descrito en el documento WO 90/14363) y sus derivados que contienen polinucleótidos svActRIIB, así como cualquier vector adecuado adicional conocido en la materia o descrito a continuación.

La invención comprende además métodos de elaboración de polipéptidos svActRIIB. Puede utilizar una variedad de otros sistemas de expresión/hospedadores. Estos sistemas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido

recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos (p.ej. baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de expresión víricos (p.ej. virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión bacterianos (p.ej., plásmido Ti o pBR322) o sistemas de células animales.

5 Las células de mamífero útiles en la producción de proteína recombinante incluyen, pero sin limitación, células VERO, células HeLa, estirpes celulares de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como Veggie CHO y estirpes celulares relacionadas que crecen en medio exento de suero (véase Rasmussen *et al.*, 1998, Cytotechnology 28: 31) o la cepa DXB11 de CHO que es deficiente en DHFR (véase Urlaub *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20), células COS tales como la estirpe COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23: 175), W138, BHK, HepG2, 3T3 (ATCC CCL 163), RIN, MDCK, A549, PC12, K562, células L, células C127, estirpes celulares BHK (ATCC CRL 10) , la estirpe celular CV1/EBNA derivada de la línea CV1 de células de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 70) (véase McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821), células de riñón embrionarias humanas tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, otras estirpes celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, HL-60, U937, HaK o células Jurkat. La expresión en mamífero permite la producción de polipéptidos secretados o solubles que pueden recuperarse del medio de crecimiento.

Usando un sistema de hospedador-vector apropiado, se producen recombinantemente los polipéptidos svActRIIB cultivando una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene las moléculas de ácido nucleico de la presente invención en condiciones que permitan la producción. Las células transformadas pueden usarse para producción de polipéptido de alto rendimiento a largo plazo. Una vez se transforman dichas células con vectores que contienen marcadores selectivos, así como el módulo de expresión deseado, pueden dejarse crecer las células en un medio enriquecido antes de cambiar a medio selectivo, por ejemplo. El marcador seleccionable se diseña para permitir el crecimiento y recuperación de células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Pueden proliferar grupos resistentes de células transformadas establemente usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para la estirpe celular empleada. Se encuentra una vista general de las proteínas recombinantes en "Methods of Enzymology", v. 185, Goeddel, D.V., ed., Academic Press (1990).

En algunos casos, tales como en expresión usando sistemas procarióticos, los polipéptidos expresados de esta invención pueden necesitar "replegarse" y oxidarse a una estructura terciaria apropiada y generarse ligamientos disulfuro para ser biológicamente activos. El replegamiento puede lograrse usando una serie de procedimientos bien conocidos en la materia. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, exponer el polipéptido solubilizado a un pH habitualmente mayor de 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección del caótopo es similar a las elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, sin embargo el caótopo se usa típicamente a una concentración menor. Son agentes caotrópicos ejemplares guanidina y urea. En la mayoría de casos, la solución de replegamiento/oxidación contendrá también un agente reductor más su forma oxidada a una relación específica para generar un potencial rédox particular que permita que ocurra el intercambio de disulfuros para la formación de puentes de cisteína. Algunos pares rédox usados comúnmente incluyen cisteína/cistamina, glutation/ditiois-GSH, cloruro cúprico, ditiotreitil-DTT/ditiano-DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos casos, puede usarse un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los codisolventes usados comúnmente incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

Además, los polipéptidos pueden sintetizarse en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Están comercialmente disponibles diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véanse, por ejemplo, Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª.Ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam *et al.*, J Am Chem Soc. 105: 6442, (1983); Merrifield, Science 232: 341-347 (1986); Barany y Merrifield, "The Peptides", Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, Nueva York, 1-284; Barany *et al.*, Int J Pep Protein Res. 30: 705-739 (1987).

Los polipéptidos y proteínas de la presente invención pueden purificarse según técnicas de purificación de proteína que son bien conocidas por los especialistas en la materia. Estas técnicas implican, a un nivel, el fraccionamiento bruto de las fracciones proteicas y no proteicas. Habiendo separado los polipéptidos peptídicos de las demás proteínas, el péptido o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir una purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad). El término "polipéptido aislado" o "polipéptido purificado", como se usa en la presente memoria, pretende hacer referencia a una composición aislable de los demás componentes, en el que el polipéptido se purifica hasta cualquier grado respecto a su estado obtenible naturalmente. Un polipéptido purificado por lo tanto hace referencia también a un polipéptido que está exento del entorno en que puede aparecer naturalmente. Generalmente, "purificado" hará referencia a una composición polipeptídica que se ha sometido a fraccionamiento para retirar diversos otros componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término "sustancialmente purificado", esta denominación hará referencia a una composición peptídica o polipeptídica en que el polipéptido o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 % o aproximadamente un 90 % o más de las proteínas de la composición.

Serán bien conocidas por los especialistas en la materia diversas técnicas adecuadas para uso en la purificación. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o por desnaturalización térmica seguida de centrifugación; cromatografía tal como cromatografía de afinidad (columnas de proteína A), intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, enfoque isoelectrico, electroforesis en gel y combinaciones de estas técnicas. Como es generalmente conocido en la materia, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que ciertas etapas pueden omitirse y seguir dando como resultado un método adecuado para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado. Se proporcionan etapas de purificación ejemplares en los Ejemplos siguientes.

Serán conocidos por los especialistas en la materia diversos métodos para cuantificar el grado de purificación del polipéptido a la vista de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad de unión específica de una fracción activa, o valorar la cantidad de péptido o polipéptido en una fracción por análisis de SDS/PAGE. Es un método preferido para valorar la pureza de una fracción polipeptídica calcular la actividad de unión de la fracción, compararla con la actividad de unión del extracto inicial y calcular por tanto el grado de purificación, valorado en la presente memoria por una "purificación en número de veces". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y si el polipéptido o péptido exhibe o no una actividad de unión detectable.

Los polipéptidos de tipo IIB de activina estabilizados se unen a ligandos que activan las cascadas de degradación muscular. Los polipéptidos svActRIIB son capaces de unirse a e inhibir la actividad de los ligandos activina A, miostatina y/o GDF-11, y tienen la capacidad de tratar enfermedades que implican atrofia muscular, así como el tratamiento de ciertos cánceres y otras enfermedades.

Los ejemplos siguientes muestran las propiedades mejoradas de los polipéptidos y proteínas svActRIIB, que tienen las sustituciones aminoácidas descritas en la presente memoria mientras que retienen la capacidad de unirse a y neutralizar miostatina, activina A o GDF-11 en ensayos *in vitro*, así como retienen la actividad *in vivo*. Estas propiedades dan como resultado proteínas y polipéptidos que tienen una fabricabilidad mejorada en comparación con otros receptores solubles.

Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan también composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas y polipéptidos svActRIIB de la presente invención. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del polipéptido o proteína mezclada con materiales farmacéuticamente aceptables y materiales de formulación fisiológicamente aceptables. La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, índice de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos y otros ácidos orgánicos); agentes voluminizantes (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; agentes tensioactivos o humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina, colesterol y tiloxapol); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol)); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticos. ("Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

La composición farmacéutica óptima se determinará por un especialista en la materia dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración pretendida, el formato de suministro y la dosificación deseada Véase por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", *supra*. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, índice de liberación *in vivo* e índice de aclaramiento *in vivo* del polipéptido. Por ejemplo, pueden ser composiciones adecuadas agua para inyecciones o disolución salina fisiológica para administración parenteral.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, puede ser un vehículo o portador adecuado agua para inyecciones, disolución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Son vehículos ejemplares adicionales disolución salina tamponada neutra o disolución

salina mezclada con seroalbúmina. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampones Tris o tampones acetato, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En una realización de la presente invención, pueden prepararse composiciones para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales ("Remington's Pharmaceutical Sciences", supra) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, la composición terapéutica puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las formulaciones pueden suministrarse con una variedad de métodos, por ejemplo mediante terapia de inhalación, por vía oral o por inyección. Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para uso en esta invención pueden estar en forma de una disolución acuosa exenta de pirógenos parenteralmente aceptable que comprende el polipéptido deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Es un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral agua destilada estéril en que se formula un polipéptido en forma de una solución estéril isotónica apropiadamente conservada. Aun otra preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico)), perlas o liposomas, que proporcionen la liberación controlada o prolongada del producto, que puede suministrarse entonces mediante inyección de liberación prolongada. Puede usarse también ácido hialurónico, y este puede tener el efecto de promover una duración prolongada en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de suministro de fármaco implantables.

En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración inyectable pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer o disolución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Pueden usarse también aminopolímeros policatiónicos no lipídicos para suministro. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores adecuados o agentes para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. En otra realización, puede formularse una composición farmacéutica para inhalación. Las disoluciones de inhalación pueden formularse también con un propelente para suministro en aerosol. En aún otra realización, pueden nebulizarse disoluciones. Se describe adicionalmente la administración pulmonar en la solicitud PCT n° PCT/US94/001875, que describe el suministro pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

Se contempla también que ciertas formulaciones puedan administrarse por vía oral. En una realización de la presente invención, las moléculas que se administran de este modo pueden formularse con o sin aquellos portadores usados normalmente en la mezcla farmacéutica de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal cuando se maximice la biodisponibilidad y se minimice la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula terapéutica. Pueden emplearse también diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes. Pueden formularse también composiciones farmacéuticas para administración oral usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia en dosificaciones adecuadas para administración oral. Dichos portadores posibilitan formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas, suspensiones y similares para ingestión por el paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando compuestos activos con un excipiente sólido y procesando la mezcla resultante de gránulos (opcionalmente después de molido), obteniendo comprimidos o núcleos de gragea. Pueden añadirse auxiliares adecuados, si se desea. Los excipientes adecuados incluyen cargas de carbohidrato o proteína, tales como azúcares incluyendo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; gomas, incluyendo arábica y de tragacanto y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Pueden usarse núcleos de gragea junto con recubrimientos adecuados tales como disoluciones de azúcar concentradas, que pueden contener también goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel Carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de lacado y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse tintes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de gragea para identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, concretamente la dosificación.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen también cápsulas duras compuestas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas compuestas por gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con cargas o aglutinantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y opcionalmente estabilizadores. En las cápsulas

blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados tales como aceites grasos, líquidos o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Resultarán evidentes composiciones farmacéuticas adicionales para los especialistas en la materia, incluyendo formulaciones que implican polipéptidos en formulaciones de suministro prolongado o controlado. Son también conocidas por los especialistas en la materia las técnicas para formular una variedad de otros medios de suministro prolongado o controlado, tales como portadores liposómicos, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación prolongada. Véase, por ejemplo, el documento PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p.ej. películas o microcápsulas. Las matrices de liberación prolongada pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919y EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22: 547-556 (1983), poli-(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); Langer *et al.*, Chem. Tech., 12: 98-105(1982)), acetato de etilenvinilo (Langer *et al.*, *supra*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación prolongada incluyen también liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la materia. Véanse, p.ej., Eppstein *et al.*, PNAS (USA), 82: 3688 (1985); EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

La composición farmacéutica para usar en la administración *in vivo* debe ser típicamente estéril. Esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando se liofiliza la composición, puede realizarse una esterilización usando este método antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en disolución. Además, las composiciones parenterales se disponen generalmente en un envase que tiene una puerta de acceso estéril, por ejemplo una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón atravesable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles en forma de disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en forma lista para usar o en una forma (p.ej. liofilizada) que requiera reconstitución antes de la administración.

En una realización específica, la presente invención está dirigida a kits para producir una unidad de administración monodosis. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer envase que tiene una proteína secada como un segundo envase que tiene una formulación acuosa. Se incluyen también dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringas prellenadas mono- y multicámara (p.ej., jeringas de líquido y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica para emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un especialista en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para tratamiento variarán por tanto dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la que se esté usando el polipéptido, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y condiciones (edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener un efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede oscilar de aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las composiciones polipeptídicas pueden preferiblemente inyectarse o administrarse por vía intravenosa. Las composiciones farmacéuticas de larga acción pueden administrarse cada tres a cuatro días, cada semana o cada dos semanas, dependiendo de la semivida e índice de aclaramiento de la formulación particular. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del polipéptido en la formulación usada. Típicamente, se administra una composición hasta que se alcanza una dosificación que consigue el efecto deseado. La composición puede administrarse por lo tanto en una sola dosis o como múltiples dosis (a la misma o diferentes concentraciones/dosificaciones) con el tiempo, o como una infusión continua. Se hace rutinariamente un refinado adicional de la dosificación apropiada. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados..

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, p.ej. por vía oral, mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimática), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea o intraperitoneal; así como por medios intranasal, entérico, tópico, sublingual, uretral, vaginal o rectal, mediante sistemas de liberación prolongada o mediante dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo intravenoso o continuamente por infusión, o mediante un dispositivo de implantación. Como alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse por vía local por implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser por difusión, bolo intravenoso de liberación medida o administración continua.

En algunos casos, los polipéptidos svActRIIB de la presente invención pueden suministrarse implantando ciertas células que se han genomaniplulado, usando métodos tales como los descritos en la presente memoria, para

expresar y secretar el polipéptido. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden inmortalizarse. Para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente recintos poliméricos o membranas biocompatibles semipermeables que permiten la liberación del producto o productos polipeptídicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores nocivos de los tejidos circundantes.

Se concibe también una terapia génica de svActRIIB *in vivo* en la que se introduce directamente en el sujeto una molécula de ácido nucleico que codifica svActRIIB o un derivado de svActRIIB. Por ejemplo, se introduce una secuencia de ácido nucleico que codifica svActRIIB en células diana mediante inyección local de un constructo de ácido nucleico con o sin un vector de suministro apropiado, tal como un vector vírico adenoasociado. Los vectores víricos alternativos incluyen, pero sin limitación, vectores de retrovirus, adenovirus, herpesvirus simple y papilomavirus. La transferencia física del vector vírico puede conseguirse *in vivo* mediante inyección local del constructo de ácido nucleico deseado u otro vector de suministro apropiado que contiene la secuencia de ácido nucleico deseada, transferencia mediada por liposoma, inyección directa (ADN desnudo) o bombardeo de micropartículas (pistola génica).

Las composiciones de la presente divulgación pueden usarse solas o en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar sus efectos terapéuticos o disminuir los efectos secundarios potenciales.

Usos de composiciones de svActRIIB

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para uso en métodos de reducción o neutralización de la cantidad o actividad de miostatina, activina A o GDF-11 *in vivo* e *in vitro*. Los polipéptidos svActRIIB tienen una alta afinidad de unión por miostatina, activina A y GDF-11, y son capaces de reducir e inhibir las actividades biológicas de al menos uno de miostatina, activina A y GDF-11.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones para uso en métodos y reactivos para tratar trastornos relacionados con la miostatina y/o relacionados con la activina A en un sujeto necesitado de dicho tratamiento mediante la administración de una dosificación eficaz de una composición de svActRIIB al sujeto. Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" hace referencia a cualquier animal, tal como mamíferos incluyendo seres humanos.

Las composiciones de la presente invención son útiles para aumentar la masa de músculo magro en un sujeto. Las composiciones pueden ser también útiles para aumentar la masa de músculo magro en proporción a la masa grasa, y disminuir por tanto la masa grasa como porcentaje del peso corporal de un sujeto. El Ejemplo 3 demuestra que los polipéptidos y proteínas svActRIIB de la invención pueden aumentar la masa de músculo magro en animales.

Los trastornos que pueden tratarse con una composición de svActRIIB incluyen, pero sin limitación, diversas formas de consunción muscular así como trastornos metabólicos tales como diabetes y trastornos relacionados, y enfermedades degenerativas óseas tales como osteoporosis.

Los trastornos de consunción muscular incluyen también distrofias tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular progresiva, distrofia muscular de tipo Becker, distrofia muscular de Dejerine-Landouzy, distrofia muscular de Erb y distrofia muscular neuroaxonal infantil. Surgen trastornos de consunción muscular adicionales de enfermedades o trastornos crónicos tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer, SIDA, insuficiencia renal, atrofia orgánica, privación de andrógenos y artritis reumatoide.

La sobreexpresión de miostatina y/o activina puede contribuir a la caquexia, un síndrome de consunción muscular grave. La caquexia es el resultado de cánceres, y surge también debido a artritis reumatoide, nefropatía diabética, insuficiencia renal, quimioterapia, lesión debida a quemaduras, así como otras causas. En otro ejemplo, se encontró que las concentraciones séricas e intramusculares de proteína inmunorreactiva con miostatina aumentaban en hombres que exhibían consunción muscular relacionada con el SIDA y estaban relacionadas inversamente con la masa exenta de grasa (González-Cadavid *et al.*, PNAS USA 95: 14938-14943 (1998)). Se ha mostrado también que los niveles de miostatina aumentan en respuesta a lesiones por quemaduras, dando como resultado un efecto muscular catabólico (Lang *et al.*, FASEB J 15, 1807-1809 (2001)). Pueden surgir afecciones adicionales que dan como resultado la consunción muscular por la inactividad debida a incapacidad, tal como confinamiento en una silla de ruedas, reposo en cama prolongado debido a apoplejía, dolencias, lesión de médula espinal, fractura o traumatismo óseo y atrofia muscular en un entorno de microgravedad (vuelo espacial). Por ejemplo, se encontró que la proteína inmunorreactiva con miostatina plasmática aumentaba después de un reposo en cama prolongado (Zachwieja *et al.* J. Gravit Physiol. 6(2): 11(1999). Se encontró también que los músculos de ratas expuestos a un entorno de microgravedad durante un vuelo en lanzadera espacial expresaban una cantidad aumentada de miostatina en comparación con los músculos de rata no expuestos (Lalani *et al.*, J. Endocrin 167 (3): 417-28 (2000)).

Además, los aumentos relacionados con la edad de las relaciones de grasa a músculo y la atrofia muscular relacionada con la edad parecen estar relacionados con la miostatina. Por ejemplo, la proteína inmunorreactiva con miostatina sérica media aumentaba con la edad en grupos de hombres y mujeres jóvenes (19-35 años de edad), de mediana edad (36-75 años) y ancianos (76-92 años de edad), mientras que la masa muscular media y masa exenta

de grasa descendían con la edad en estos grupos (Yarasheski *et al.* J Nutr Aging 6(5): 343-8 (2002)). Además, se ha encontrado que la miostatina se expresa a bajos niveles en músculo cardíaco y la expresión se regula positivamente en cardiomiocitos después de infarto (Sharma *et al.*, J Cell Physiol. 180 (1): 1-9 (1999)). Por lo tanto, reducir los niveles de miostatina puede mejorar la recuperación del músculo cardíaco después de infarto.

5 La miostatina parece influir también en trastornos metabólicos que incluyen diabetes de tipo 2, diabetes sacarina no insulino dependiente, hiperglicemia y obesidad. Por ejemplo, se ha mostrado que la falta de miostatina mejora los fenotipos obeso y diabético de dos modelos de ratón (Yen *et al.* FASEB J. 8: 479 (1994)). Los polipéptidos svActRIIB de la presente divulgación son adecuados para tratar dichos trastornos metabólicos. Por lo tanto, administrar las composiciones de la presente invención mejorará la diabetes, obesidad y afecciones hiperglicémicas en los sujetos
10 adecuados. Además, las composiciones que contienen los polipéptidos svActRIIB pueden disminuir la ingesta de alimento en individuos obesos.

Administrar los polipéptidos ActRIIB estabilizados de la presente invención puede mejorar la resistencia ósea y reducir la osteoporosis y otras enfermedades óseas degenerativas. Se ha encontrado, por ejemplo, que los ratones deficientes en miostatina mostraban un contenido y densidad minerales aumentados del húmero de ratón y un
15 contenido mineral aumentado del hueso tanto trabecular como cortical en las regiones donde se enlazan los músculos, así como una masa muscular aumentada (Hamrick *et al.* Calcif Tissue Int 71(1): 63-8 (2002)). Además, las composiciones de svActRIIB de la presente invención pueden usarse para tratar los efectos de la privación de andrógenos en casos tales como terapia de privación de andrógenos usada para el tratamiento de cáncer de próstata, por ejemplo.

20 La presente invención proporciona también composiciones para uso en métodos de aumento de la masa muscular en animales comestibles mediante la administración de una dosificación eficaz de las proteínas svActRIIB al animal. Puesto que el polipéptido de miostatina C-terminal maduro es similar o idéntico en todas las especies ensayadas, se esperaría que los polipéptidos svActRIIB fueran eficaces para aumentar la masa de músculo magro y reducir la grasa en cualquier especie agrícola importante, incluyendo vacunos, pollo, pavos y cerdos.

25 Los polipéptidos svActRIIB y composiciones de la presente invención antagonizan también la actividad de la activina A, como se muestra en los ensayos *in vitro* siguientes. La activina A es conocida por expresarse en ciertos tipos de cáncer, particularmente tumores gonádicos tales como carcinomas ováricos, y causar una caquexia grave. (Ciprano *et al.* Endocrinol 141 (7): 2319-27 (2000), Shou *et al.*, Endocrinol 138 (11): 5000-5 (1997); Coerver *et al.*, Mol Endocrinol 10(5): 534-43 (1996); Ito *et al.* British J Cancer 82(8): 1415-20 (2000) y Lambert-Messerlian, *et al.*, Gynecologic Oncology 74: 93-7 (1999). Por lo tanto, las composiciones de la presente divulgación pueden usarse
30 para tratar afecciones relacionadas con la sobreexpresión de activina A, así como la expresión de miostatina, tales como caquexia por ciertos cánceres y el tratamiento de ciertos tumores de tipo gonádico.

Además, los polipéptidos svActRIIB de la presente invención son útiles para detectar y cuantificar miostatina, activina o GDF-11 en cualquier serie de ensayos. En general, los polipéptidos ActRIIB estabilizados de la presente
35 invención son útiles como agentes de captura para unirse a e inmovilizar miostatina, activina A o GDF-11 en una variedad de ensayos, de forma similar a lo descrito, por ejemplo, en Asai, ed., "Methods in Cell Biology" 37, "Antibodies in Cell Biology", Academic Press, Inc., Nueva York (1993). Los polipéptidos pueden marcarse de alguna manera o pueden reaccionar con una tercera molécula, tal como un anticuerpo, que está marcada para posibilitar la detección y cuantificación de la miostatina. Por ejemplo, un polipéptido o una tercera molécula pueden modificarse
40 con un resto detectable, tal como biotina, que puede unirse entonces a una cuarta molécula, tal como estreptavidina marcada enzimáticamente u otras proteínas. (Akerstrom, J Immunol 135: 2589 (1985); Chaubert, Mod Pathol 10: 585 (1997)).

Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplo 1

45 Expresión y purificación de polipéptidos svActRIIB

Se usaron los siguientes métodos para expresar y purificar los polipéptidos ActRIIB estabilizados.

Se aisló el ADNc del receptor de tipo IIB de activina de una colección de ADNc de origen en testículo humano (Clontech, Inc.) y se clonó como se describe en la solicitud de EE.UU. nº de serie 11/590.962y la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2007/0117130.

50 Se usó el siguiente método para producir los polipéptidos svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) y ActRIIB-Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21). Se fusionaron polinucleótidos que codifican svActRIIB, (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 5), o polinucleótidos que codifican ActRIIB (E28W) (SEQ ID NO: 19) con polinucleótidos que codifican Fc de IgG2 humano (SEQ ID NO: 22) a través de polinucleótidos que codifican una secuencia ligadora de bisagra (SEQ ID NO: 26) usando extensión por superposición de PCR usando cebadores que contienen la mutación resultante en la
55 sustitución aminoacídica en posición 28 de E a W, y en la posición 44 de S a T. La secuencia polinucleotídica completa es la SEQ ID NO: 9 para svActRIIB-IgG Fc (E28W, S44T) y la SEQ ID NO: 20 para ActRIIB-ActRIIB-IgG Fc (E28W). Se subclonaron fragmentos de ADN bicatenarios en los vectores pTT5 (Biotechnology Research Institute,

National Research Council Canada (NRCC), 6100 Avenue Royalmount, Montréal (Quebec) Canadá H4P 2R2), pDSR α descrito en el documento WO/9014363) y/o derivados de pDSR α .

Se llevó a cabo la expresión transitoria de polipéptidos ActRIIB-Fc estabilizados como sigue.

5 Se expresaron transitoriamente los polipéptidos svActRIIB-IgG Fc, (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) y ActRIIB-IgG Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21) en células 293-6E adaptadas a suspensión exenta de suero (National Research Council of Canada, Ottawa, Canadá) mantenidas en medio FreeStyle™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) suplementado con geneticina 250 μ g/ml (Invitrogen) y 0,1 % de Pluronic F68 (Invitrogen). Se efectuaron las transfecciones en forma de cultivos de 1 l. Brevemente, se hizo crecer el inóculo celular a $1,1 \times 10^6$ células/ml en un matraz agitado Fernbach de 4 l (Corning, Inc.). Se mantuvo el cultivo del matraz agitado en una plataforma agitadora Innova 2150 (News Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 65 RPM, que se colocó en una incubadora humidificada mantenida a 37 °C y 5 % de CO₂. En el momento de la transfección, se diluyeron las células 293-6E a $1,0 \times 10^6$ células/ml.

15 Se formaron complejos de transfección en 100 ml de medio FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Se añadió en primer lugar 1 mg de ADN de plásmido al medio, seguido de 3 ml del reactivo de transfección FuGene HD (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Se incubó el complejo de transfección a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos y se añadió entonces a las células en el matraz agitado. 24 horas después de la transfección, se añadió peptona TN1 al 20 % (p/v) (OrganoTechnie S.A., TeknieScience, QC, Canadá) para alcanzar una concentración final de 0,5% (p/v). Se efectuó la transfección/expresión durante 4-7 días, después de lo cual se recolectó el medio acondicionado por centrifugación a 4.000 rpm durante 60 minutos a 4 °C.

20 Se llevó a cabo la transfección estable y expresión como sigue. Se crearon estirpes celulares de svActRIIB-IgG-Fc transfectando células hospedadoras CHO estables con los plásmidos de expresión que contienen polinucleótidos que codifican svActRIIB-IgG Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 9) o ActRIIB-IgG Fc (E28W) (SEQ ID NO: 20) usando un procedimiento de electroporación estándar. Después de la transfección de la estirpe celular hospedadora con los plásmidos de expresión, se hicieron crecer las células en medio de selección exento de suero sin GHT durante 2-3 semanas para permitir la selección del plásmido y la recuperación de las células. Se seleccionan las células hasta que consigue más de un 85 % de viabilidad. Se cultivó entonces este conjunto de células transfectadas en medio que contiene metotrexato 150 nM.

25 En un ensayo de expresión de 6 días, los conjuntos de células que expresan svActRIIB-Fc (E28W, S44T) mostraban mayor título celular, rendimiento del crecimiento y una productividad específica mejorada (picogramos/célula/día) de proteína producida en comparación con los conjuntos de células que expresan ActRIIB-Fc (E28W). Conjuntos seleccionados, por ejemplo, producían aproximadamente 1,2 g/l de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) en comparación con 0,9 g/l para ActRIIB-Fc (E28W).

30 Cada una de las estirpes celulares que expresan svActRIIB-Fc (E28W, S44T) y ActRIIB-Fc (E28W) se aumentó de escala usando un proceso alimentado por lotes típico. Se inocularon las células en un biorreactor Wave (Wave Biotech LLC). Se alimentaron los cultivos tres veces con alimentaciones en bolo. Se recolectaron 10 l el día 10, se recolectó el resto el día 11; ambas recolecciones experimentaron filtración profunda seguida de filtración estéril. Se filtró el medio acondicionado a través de un prefiltro de 25,4 cm de 0,45/0,2 micrómetros, seguido de filtración a través de un filtro de 15,2 cm de 0,2 micrómetros.

Purificación de proteína

35 Se cargaron directamente aproximadamente 5 l de medio acondicionado en una columna de proteína A de 220 ml, la columna MabSelect™ (GE Healthcare). Se preequilibró la columna con PBS (disolución salina tamponada con fosfato: cloruro de potasio 2,67 mM, cloruro de sodio 138 mM, fosfato de potasio monobásico 1,47 mM, fosfato de sodio dibásico 8,1 mM, pH 7,4). Se lavó la columna con el tampón de equilibrado hasta que la lectura a DO280 era aproximadamente cero, y se eluyó entonces la proteína con ácido acético 0,1 M.

45 Se aplicó el conjunto Mabsselect™ a una columna de 300 ml SP-HP (GE Healthcare) (5 x 15 cm). Se preequilibró la columna con NaOAc 10 mM, pH 5. Se lavó entonces la columna con el tampón de equilibrado hasta que la lectura a DO280 era aproximadamente 0. Se eluyó la columna con 20 volúmenes de columna de un tampón de gradiente de NaCl 0-150 mM en NaOAc 10 mM, pH 5. Se concentró el grupo de SP-HP y se filtró con un filtro de acetato de celulosa de 0,2 μ m (Corning).

Se exponen las secuencias de las proteínas usadas en la Tabla siguiente.

50

ActRIIB-Fc	Secuencia de ActRIIB	Ligador de bisagra	Fc de IgG2
svActRIIB-IgG ₂ Fc (E28W, S44T)	ETRWCIYYNANWELERT NQTGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKG CWLDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNE RFTHLPEAGGPEVTYEPP	GGGGSV ECPPCP (SEQ ID NO: 27)	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
(SEQ ID NO: 10)	PTAPT (SEQ ID NO: 6)		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSGFSFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO:22)
ActRIIB-IgG ₂ Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21)	ETRWCIYYNANWELERT NQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKG CWLDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNE RFTHLPEAGGPEVTYEPP PTAPT (SEQ ID NO: 19)	GGGGSV ECPPCP (SEQ ID NO: 27)	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSGFSFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)

Ejemplo 2

Caracterización de polipéptidos

5 Se diluyeron muestras de polipéptidos svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) purificado mediante la etapa de MabSelect™ y ActRIIB-Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21) purificado mediante la etapa de columna SP-HP, como se describe anteriormente, con PBS, pH 7,4 a 0,2 mg/ml. Se determinó entonces el perfil de glicosilación de los polipéptidos usando SEC como se describe a continuación.

10 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se efectuaron los experimentos en un sistema de HPLC Agilent 1100 con dos columnas (TOSHAAS G3000swxl, 7,8 x 300 mm) en serie. Se usó 2x PBS como fase móvil a 0,5 ml/minuto.

15 La Figura 1 muestra una comparación entre ActRIIB-Fc (E28W) y svActRIIB-Fc (E28W, S44T) en una columna de SEC usando los protocolos descritos anteriormente. svActRIIB-Fc (E28W, S44T) muestra un solo pico en comparación con ActRIIB-Fc (E28W), que muestra tres picos. Estos corresponden al grado de glicosilación N-ligada en la posición N42 de los dímeros de Fc de ambas proteínas. El pico único del polipéptido svActRIIB-Fc (E28W, S44T) corresponde a asparaginas N-ligadas totalmente glicosiladas en la posición N42 del dímero. Los tres picos de ActRIIB-Fc (E28W) corresponden a (de izquierda a derecha) asparaginas totalmente glicosiladas en N42, asparaginas parcialmente glicosiladas en N42 y asparaginas no glicosiladas en N42. Por lo tanto, esto demuestra que la molécula de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) está totalmente glicosilada en comparación con ActRIIB-Fc (E28W), que es heterogénea con respecto a este sitio de glicosilación, y por tanto más difícil de purificar. Además, estudios preliminares indican que la molécula de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) tiene además propiedades de fabricabilidad mejoradas como se expone a continuación. Estudios adicionales demostraron también que el pico menos glicosilado de ActRIIB-Fc (E28W) tiene menor estabilidad física y térmica que las moléculas parcial y totalmente glicosiladas.

25 La determinación de los valores de K_D y CI₅₀ de los polipéptidos receptores para activina A, miostatina y GDF-11 se obtuvo como se describe a continuación.

Ensayos de equilibrio KINEX A™

30 Se usaron ensayos de unión en equilibrio basados en disolución usando la tecnología KinExA™ (Sapidyne Instruments, Inc.) para determinar el equilibrio de disociación (K_D) de la unión de ligando a polipéptidos ActRIIB-Fc. Se prerrecubrieron perlas UltraLink Biosupport (Pierce) con aproximadamente 100 µg/ml de cada uno de miostatina, GDF-11 y activina A durante una noche y se bloquearon entonces con BSA. Se incubaron muestras de ActRIIB-Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21) y svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) 1 pM y 3 pM con diversas concentraciones

- (0,7 fM a 160 pM) de miostatina, activina A y GDF-11 respectivamente, en tampón de muestra a temperatura ambiente durante 8 horas antes de pasar a través de perlas recubiertas con ligando. Se cuantificó la cantidad de receptor soluble unido a perla mediante anticuerpo de cabra anti-Fc humano marcado fluorescentemente (Cy5) a 1 mg/ml en Superblock. La señal de unión es proporcional a la concentración de receptor soluble libre en equilibrio con una concentración dada de miostatina, activina A o GDF-11. Se obtuvo la K_D a partir de la regresión no lineal de las curvas competitivas usando un modelo de unión homogénea de un sitio de curva dual proporcionado por el software KinEx A™ (Sapidyne Instruments, Inc.). Los valores de K_D obtenidos para cada uno se dan en la tabla siguiente.

	Miostatina	GDF-11	Activina A
ActRIIB-Fc (E28W)	0,1 pM	0,1 pM	0,2 pM
sv ActRIIB-Fc (E28W, S44T)	0,1 pM	0,1 pM	0,1 pM

Ensayo de actividad basado en células C2C12

- 10 Se ensayó la capacidad de ActRIIB-Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21) y svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) de inhibir la unión de activina A, GDF-11 o miostatina a receptor IIB-Fc de activina de tipo silvestre usando un ensayo de actividad basado en células como se describe a continuación.

- Se generó una estirpe celular informadora sensible a miostatina/activina/GDF-11 mediante la transfección de células de mioblasto C2C12 (ATCC No: CRL-1772) con un constructo pMARE-luc. El constructo pMARE-luc se elabora clonando doce repeticiones de la secuencia CAGA, que representan los elementos sensibles a miostatina/activina (Dennler *et al.* EMBO 17: 3091-3100 (1998)), en un vector informador pLuc-MCS (Stratagene nº de cat. 219087) en dirección 5' de la secuencia TATA. Las células C2C12 expresan naturalmente el receptor IIB de activina sobre su superficie celular. Cuando la miostatina/activina/GDF-11 se une a los receptores celulares, se activa la ruta de Smad y se une la Smad fosforilada al elemento sensible (Macias-Silva *et al.* Cell 87: 1215 (1996)), dando como resultado la expresión del gen de luciferasa. Se midió entonces la actividad de luciferasa usando un kit de ensayo informador de luciferasa comercial (nº de cat. E4550, Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante. Se usó una estirpe estable de células C2C12 que se ha transfectado con pMARE-luc (C2C12/pMARE) para medir la actividad según el siguiente procedimiento. Se sembraron las células informadoras en cultivos de 96 pocillos. Se efectuaron cribados usando diluciones de las fusiones ActRIIB-IgG2 Fc como se describe anteriormente con la concentración fijada en activina A, miostatina y GDF-11 4 nM. Se preincubó cada uno de estos ligandos con los receptores a varias concentraciones. Se midió la actividad determinando la actividad de luciferasa en los cultivos tratados. Se determinaron los valores de CI_{50} para cada polipéptido. Se muestran estos en la Tabla siguiente. Se dan estos valores en la Tabla siguiente.

	Miostatina	GDF-11	Activina A
ActRIIB-Fc (E28W)	0,95 nM	2,4 nM	3,2 nM
svActRIIB-Fc (E28W, S44T)	1,07 nM	2,4 nM	3,6 nM

- 30 Por tanto, las actividades basadas en células son aproximadamente las mismas para ActRIIB-Fc (E28W) y svActRIIB-Fc (E28W, S44T).

Estabilidad a bajo pH

- La estabilidad de una proteína a bajo pH es un parámetro útil en la consideración de la fabricabilidad de la proteína, puesto que la etapa de inactivación vírica de un proceso de producción comercial se lleva a cabo típicamente a bajo pH, tal como entre aproximadamente pH 3,0 a 4,0.

- Para valorar los efectos sobre la estabilidad proteica a corto plazo a bajo pH experimentados durante la etapa de inactivación vírica de la purificación de proteína comercial, se efectuó la siguiente prueba. Se diluyó cada proteína a 10 mg/ml en acetato de sodio 100 mM, pH 3,5. Se almacenó ésta a 25 °C a tiempo 0, a las 2 horas y a las 24 horas usando análisis de SEC. Se efectuó el análisis de SEC como se describe anteriormente, y se determinó el porcentaje de agregados de alto peso molecular.

% de agregados de HMW

	T = 0	T = 2 horas	T = 4 horas
ActRIIB-Fc (E28W)	1,53	1,36	13,74
svActRIIB-Fc (E28W, S44T)	1,66	2,17	8,93

Por tanto, el porcentaje de agregados de alto peso molecular producidos a pH 3,5 es sustancialmente menor para svActRIIB-Fc (E28W, S44T) que para ActRIIB-Fc (E28W) a las 4 horas.

- 5 Estudios adicionales mostraron que svActRIIB-Fc (E28W, S44T) mostraba mejor reversibilidad que ActRIIB-Fc (E28W) por la exposición a pH 3,0, 3,5 y 5,0, y que svActRIIB-Fc (E28, S44T) era más homogéneo que ActRIIB-Fc (E28W) a todos los pH.

10 Por tanto, los polipéptidos svActRIIB-Fc (E28W, S44T) demuestran tener características de fabricabilidad mejoradas, en particular una estabilidad mejorada a bajo pH y mayor homogeneidad a todos los pH en comparación con ActRIIB-Fc (E28W), reteniendo la capacidad de inhibir la actividad de activina A, miostatina y GDF-11.

Ejemplo 3

Determinación de la eficacia *in vivo*

15 Se adquirieron ratones C57Bl/6 hembra de 11 semanas en Charles River Laboratories. Se administró a los ratones (10 ratones por grupo) una sola dosis (10 mg/kg) de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) o vehículo (PBS). Se determinó la masa corporal magra por RMN (PIXImus, GE LUNAR Corporation) a los 3, 7, 10 y 14 días después de la administración de dosis para los 10 animales de cada grupo. Se muestran los resultados de cada grupo de ratones en la Figura 2. Puede verse que una sola dosis de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) aumentaba significativamente la masa corporal magra en los animales. ($P < 0,001$, basado en ANOVA de medidas repetidas. $n = 10$ animales por grupo).

20 Se llevó a cabo un estudio para determinar la eficacia de la respuesta a la dosis como sigue. Se administraron por vía subcutánea dosis únicas crecientes de 0, 0,3, 3, 10 y 30 mg/kg de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) en PBS a ratones C57Bl/6 hembra de 10-12 semanas (Charles River Laboratories). Había inicialmente 6 animales en cada grupo de dosificación, incluyendo el grupo de control de PBS. Se determinó la masa corporal magra por RMN (PIXImus, GE LUNAR Corporation) cada 2 a 4 días durante los 42 días del estudio. Al final de cada semana, se sacrificó un animal de cada grupo para obtener datos adicionales (6 en total cada semana de los 6 grupos) y se determinó la masa corporal magra para los animales restantes en semanas posteriores. Se precisan los resultados en la Figura 3. Puede verse que el polipéptido svActRIIB-Fc (E28W, S44T) a todas las dosis aumentaba significativamente la masa muscular en los animales de manera dependiente de la dosis.

30 En estudios adicionales, se efectuaron comparaciones frente a frente entre ActRIIB-Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21) y svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10) en ratones C57Bl/6 hembra (Charles River Laboratories, 10 animales por grupo) para medir el aumento de masa muscular magra y los cambios de peso corporal después de una sola dosis de 10 mg/kg de cada receptor soluble en comparación con un grupo de control (administrado con PBS). Se determinó la masa corporal magra por RMN (PIXImus, GE LUNAR Corporation), y se determinó el cambio de peso corporal pesando los animales periódicamente durante 37 días. Los resultados al final de este estudio comparativo fueron que ActRIIB-Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21) mostraba un aumento del 24 % de la masa muscular magra y un aumento del 25 % del peso corporal en comparación con un aumento del 25 % de la masa de músculo magro y un aumento del 20 % del peso corporal para svActRIIB-Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10), en comparación con un aumento del 5 % de la masa de músculo magro y un aumento del 9 % del peso corporal para el grupo de control.

40 Por lo tanto, puede verse que svActRIIB-Fc (E28W, S44T) retiene una eficacia *in vivo* comparable con ActRIIB-Fc (E28W), mientras que tiene características de fabricabilidad mejoradas.

Ejemplo 4

Fabricabilidad mejorada con ligadores de bisagra modificados

45 Se construyeron ligadores y regiones de bisagra modificadas adicionales para probar la mejora adicional de expresión y fabricabilidad de proteína de los polipéptidos ActRIIB (E28W, S44T) estabilizados. Se generaron secuencias ligadoras/de bisagra modificadas basadas en modificaciones del ligador de bisagra nº 1 usando métodos de mutagénesis PCR por extensión de superposición, según Mikaelian *et al.*, Methods in Molecular Biology, 57, 193-202 (1996) y metodología bien conocida.

ES 2 600 491 T3

Los ligadores de bisagra modificados diseñados para actuar bien con fusiones de IgG2-Fc son los ligadores de bisagra nº 2-7 expuestos a continuación (en comparación con las secuencias del ligador de bisagra nº 1).

polinucleótido ligador de bisagra nº 1

ggagggggaggatctgtcgagtgcccaccgtgccca (SEQ ID NO: 26).

5 polipéptido ligador de bisagra nº 1

GGGGSVECPPCP (SEQ ID NO: 27)

polinucleótido ligador de bisagra nº 2

ggagggggaggatctgagcgcaaatgtgtgtcgagtgcccaccgtgc (SEQ ID NO: 37)

péptido ligador de bisagra nº 2

10 GGGGSERKCCVECPPC (SEQ ID NO: 38)

polinucleótido ligador de bisagra nº 3

ggagggggaggatctggtggaggtggttcaggtccaccgtgc (SEQ ID NO: 39)

péptido ligador de bisagra nº 3

GGGSGGGGSGPPC (SEQ ID NO: 40)

15 polinucleótido ligador de bisagra nº 4

ggagggggaggatctggtggaggtggttcaggtccaccggga (SEQ ID NO: 41)

péptido ligador de bisagra nº 4

GGGSGGGGSGPPG (SEQ ID NO: 42)

polinucleótido ligador de bisagra nº 5

20 ggagggggaggatctgagcgcaaatgtccacctgtgtcgagtgcccaccgtgc (SEQ ID NO: 43)

péptido ligador de bisagra nº 5

GGGGSERKCPPCVCPPC (SEQ ID NO: 44)

péptido ligador de bisagra nº 6

GPASGGPASGPPCP (SEQ ID NO: 45)

25 péptido ligador de bisagra nº 7

GPASGGPASGCPPCVCPPCP (SEQ ID NO: 46)

Se diseñaron los siguientes ligadores de bisagra nº 8 a nº 10 siguientes para actuar bien con el Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 23) o el Fc de IgG1 modificado dado a continuación (SEQ ID NO: 47 a continuación).

Fc de IgG1 modificado

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
30 PGK (SEQ ID NO: 47)

péptido ligador de bisagra nº 8

GGGGSVDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 48)

péptido ligador de bisagra nº 9

GGGGSVDKTHTGPPCP (SEQ ID NO: 49)

35 péptido ligador de bisagra nº 10

GGGSGGGGSVDKHTHTGPPCP (SEQ ID NO: 50)

Se efectuó el ensayo de secuencias ligadoras de bisagra modificadas con svActRIIB-Fc (28W, S44T) como sigue Se subclonaron polinucleótidos que codifican svActRIIB, (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 5), polinucleótidos que codifican los ligadores de bisagra modificados mostrados anteriormente y polinucleótidos que codifican Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 22) o polinucleótidos que codifican Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 23) o Fc de IgG1 modificado (SEQ ID NO: 47) en vectores como se describen en el Ejemplo 1, y se expresaron usando el sistema de expresión transitoria 293-6E como se describe en el Ejemplo 1, excepto por los siguientes cambios: se usó medio F17 (Invitrogen) suplementado con Pluronic 1,1 mg/ml, L-glutamina 6 mM y geneticina 25 µg/ml (Invitrogen) en lugar de medio Freestyle 293 como se describe en Durocher *et al.*, Nucleic Acids Research 30, nº 3, e9 (2002)). Se hicieron crecer los cultivos durante 7 días a 37 °C después de la transfección. Se centrifugaron las alícuotas para retirar células y se mezcló el sobrenadante con tampón de carga antes de calentar y cargar en un gel de tris-glicina al 4-20 % para análisis por transferencia Western. Después de transferir la proteína a una membrana de nitrocelulosa, se sondearon muestras con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con hidrógeno peroxidasa (Pierce nº 31423) a una dilución de 1:1000.

Se efectuó la purificación de proteína usando el siguiente procedimiento. Se concentraron aproximadamente 0,25 l de medio acondicionado que contiene las variantes svActRIIB-Fc usando un filtro de flujo tangencial de membrana de 0,46 m² 10K. Se aplicó el material concentrado a una columna Protein A High Performance Column™ (GE Healthcare) de 5 ml que se había equilibrado con PBS (de Dulbecco sin cloruro de magnesio ni cloruro de calcio). Después de lavar la columna con el tampón de equilibrado hasta que la absorbancia a 280 nm (DO₂₈₀) fuera menor de 0,1, se eluyó la proteína unida con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7, e inmediatamente se neutralizó con Tris-HCl 1 M, pH 8,5.

Se determinaron la porción de agregados en porcentaje y la porción de semimolécula en porcentaje mediante el siguiente método. Se efectuaron experimentos de cromatografía de exclusión por tamaño desnaturalizantes inyectando una alícuota de 50 µl de cada muestra en un sistema HPLC con dos columnas de exclusión por tamaño (TOSHAAS G3000swxl) en serie. La fase móvil contiene GuHCl 5 M en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se diluyeron todas las muestras a 1 mg/ml en PBS con GuHCl 7 M. Se determina la porción de agregado en porcentaje a partir de las áreas de pico totales de los picos eluidos antes del pico principal, mientras que se determina la porción de semimolécula en porcentaje a partir de las áreas de pico totales de los picos eluidos después del pico principal. Se cree que la semimolécula representa semimoléculas inactivas.

Se exponen la distribución de agregados y semimoléculas de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) con los diversos ligadores de bisagra en la siguiente tabla.

Secuencia ligadora de bisagra	% de agregados	% semimoléculas
GGGGSVECPPC (SEQ ID NO: 27)	0,63	15,12
GGGGSERKCCVECPPC (SEQ ID NO: 38)	15,01	7,19
GGGSGGGGSGPPC (SEQ ID NO: 40)	0,56	3,83
GGGSGGGGSGPPG (SEQ ID NO: 42)	0,00	99,03
GGGGSERKCPPCVCPPC (SEQ ID NO: 44)	1,09	3,81

Por tanto, ciertos ligadores pueden mejorar la fabricabilidad del ActRIIB-Fc (E28W, S44T) estabilizado según estas pruebas preliminares al reducir el porcentaje de semimoléculas producidas.

La tabla siguiente identifica las secuencias como se enumeran en el listado de secuencias.

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	dominio extracelular de ActRIIB, polinucleótido
2	dominio extracelular de ActRIIB, polipéptido
3	polinucleótido de svActRIIB (E28W, S44T) con secuencia señal

ES 2 600 491 T3

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
4	polipéptido de svActRIIB (E28W, S44T) con secuencia señal
5	polinucleótido de svActRIIB (E28W, S44T) sin secuencia señal
6	polipéptido de svActRIIB (E28W, S44T) sin secuencia señal
7	polinucleótido de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) con secuencia señal
8	polipéptido de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) con secuencia señal
9	polinucleótido de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) sin secuencia señal
10	polipéptido de svActRIIB-Fc (E28W, S44T) sin secuencia señal
11	polinucleótido de svActRIIB (E28Y, S44T) con secuencia señal
12	polipéptido de svActRIIB (E28Y, S44T) con secuencia señal
13	polinucleótido de svActRIIB (E28Y, S44T) sin secuencia señal
14	polipéptido de svActRIIB (E28Y, S44T) sin secuencia señal
15	polinucleótido de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) con secuencia señal
16	polipéptido de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) con secuencia señal
17	polinucleótido de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) sin secuencia señal
18	polipéptido de svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) sin secuencia señal
19	polipéptido de ActRIIB (E28W) sin secuencia señal
20	polinucleótido de ActRIIB-Fc (E28W) sin secuencia señal
21	polipéptido de ActRIIBFc (E28W) sin secuencia señal
22	secuencia polipeptídica de IgG2Fc
23	secuencia polipeptídica de IgG1Fc
24	secuencia polipeptídica de IgG4Fc
25	secuencia aminoacídica de ligador
26	secuencia polinucleotídica de ligador de bisagra nº 1
27	secuencia peptídica de ligador de bisagra nº 1
28	región de bisagra de IgG2
29	región de bisagra de IgG1
30	región de bisagra de IgG4

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
31	secuencia señal alternativa, polipéptido
32	secuencia señal, polipéptido
33	ActRIIB de tipo silvestre de acceso NP 001097
34	secuencia polipeptídica de activina
35	secuencia polipeptídica de miostatina
36	secuencia polipeptídica de GDF-11
37	secuencia de ligador de bisagra nº 2, polinucleótido
38	secuencia de ligador de bisagra nº 2, péptido
39	secuencia de ligador de bisagra nº 3, polinucleótido
40	secuencia de ligador de bisagra nº 3, péptido
41	secuencia de ligador de bisagra nº 4, polinucleótido
42	secuencia de ligador de bisagra nº 4, péptido
43	secuencia de ligador de bisagra nº 5, polinucleótido
44	secuencia de ligador de bisagra nº 5, péptido
45	secuencia de ligador de bisagra nº 6, péptido
46	secuencia de ligador de bisagra nº 7, péptido
47	secuencia polipeptídica de Fc de IgG1 modificada
48	secuencia de ligador de bisagra nº 8, péptido
49	secuencia de ligador de bisagra nº 9, péptido
50	secuencia de ligador de bisagra nº 10, péptido

La presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, que se pretenden como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Es más, resultarán evidentes para el especialista en la materia diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, a partir de la descripción anterior y los dibujos acompañantes. Dichas modificaciones pretenden entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

Listado de secuencias

<110> AMGEN INC.
 SUN, Jeonghoon
 5 TAM, Lei-Ting Tony
 MICHAELS, Mark Leo
 BOONE, Thomas C.
 DESHPANDE, Rohini
 10 LI, Yue-Sheng
 HAN, HQ

<120> POLIPÉPTIDOS RECEPTORES ESTABILIZADOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> A-1450-WO-PCT
 15

<140> a asignar
 <141> 24-11-2009

<150> 61/200.250
 20 <151> 26-11-2008

<150> 61/259.060
 <151> 11-06-2009

25 <160> 50

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 30 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 35 <221> CDS
 <222> (1)..(402)

<400> 1

atg acg gcg ccc tgg gtg gcc ctc gcc ctc ctc tgg gga tgc ctg tgc	48
Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys	
1 5 10 15	
gcc ggc tct ggg cgt ggg gag gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac	96
Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr	
20 25 30	
aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc	144
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg	
35 40 45	
tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc	192
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg	
50 55 60	
aac agc tct ggc acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat	240
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp	
65 70 75 80	
40 gac ttc aac tgc tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac	288

ES 2 600 491 T3

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc 336
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

ttc act cat ttg cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca 384
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

ccc ccg aca gcc ccc acc 402
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 130

5 <210> 2
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

10 Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 130

15 <210> 3
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(387)
 <400> 3

ES 2 600 491 T3

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag 96
 Val Gln Cys Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30
 ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag 144
 Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45
 gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc 192
 Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
 50 55 60
 atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac 240
 Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 65 70 75 80
 gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc 288
 Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe
 85 90 95
 tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca 336
 Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
 100 105 110
 gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc 384
 Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Thr Ala Pro
 115 120 125
 acc 387
 Thr

<210> 4
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30
 Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45
 Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
 50 55 60
 Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
 100 105 110
 Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 115 120 125
 Thr

10

ES 2 600 491 T3

<210> 5
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)

10 <400> 5

gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg 1 5 10 15	48
acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg 20 25 30	96
ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu 35 40 45	144
gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln 50 55 60	192
gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys 65 70 75 80	240
gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly 85 90 95	288
ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr 100 105 110	330

15 <210> 6
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 6

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg 1 5 10 15	
Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg 20 25 30	
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu 35 40 45	
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln 50 55 60	
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys 65 70 75 80	
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly 85 90 95	
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr 100 105 110	

25 <210> 7
 <211> 1071

ES 2 600 491 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1071)

5

<400> 7

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tgt gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag	96
Val Gln Cys Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu	
20 25 30	
ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag	144
Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln	
35 40 45	
gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc	192
Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr	
50 55 60	
atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac	240
Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr	
65 70 75 80	
gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc	288
Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe	
85 90 95	
tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca	336
Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro	
100 105 110	
gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc	384
Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro	
115 120 125	

10

ES 2 600 491 T3

acc gga ggg gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct 432
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 130 135 140

gtg gca gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc 480
 Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 145 150 155 160

ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg 528
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 165 170 175

agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg 576
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 180 185 190

gag gtg cat aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc 624
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 195 200 205

acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg 672
 Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220

aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc 720
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 225 230 235 240

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 768
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 816
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 260 265 270

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 864
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 275 280 285

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca 912
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300

cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc 960
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1008
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1056
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350

ctg tct ccg ggt aaa 1071
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 8
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

ES 2 600 491 T3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30
 Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45
 Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
 50 55 60
 Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
 100 105 110
 Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 115 120 125
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 130 135 140
 Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 165 170 175
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 180 185 190
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 195 200 205
 Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 260 265 270
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 275 280 285
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355

ES 2 600 491 T3

<211> 1014
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1014)

<400> 9

10
 gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48
 Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30
 ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc 144
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag 192
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60
 gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt 240
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg 288
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95
 ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc gga ggg 336
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly
 100 105 110
 gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga 384
 Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 115 120 125
 ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc 432

ES 2 600 491 T3

Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	130					135					140					
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	480
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
145				150						155					160	
gac	ccc	gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	528
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				165					170						175	
aat	gcc	aag	aca	aag	cca	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	acg	ttc	cgt	576
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	
			180						185					190		
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtt	gtg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aag	624
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		195						200						205		
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	672
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
	210					215					220					
aaa	acc	atc	tcc	aaa	acc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	720
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
225					230					235					240	
acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	768
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				245					250					255		
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	816
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			260					265					270			
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	aca	cct	ccc	atg	864
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	
		275					280					285				
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	912
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	290					295					300					
aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	960
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
305					310					315					320	
gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	1008
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				325					330					335		
ggt	aaa															1014
Gly	Lys															

<210> 10
 <211> 338
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

ES 2 600 491 T3

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 130 135 140
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 145 150 155 160
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 165 170 175
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 180 185 190
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 195 200 205
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 210 215 220
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 225 230 235 240
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 245 250 255
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 260 265 270
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 275 280 285
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 290 295 300
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 305 310 315 320
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

Gly Lys

- 5 <210> 11
- <211> 387
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

ES 2 600 491 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(387)

5 <400> 11

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tgt gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag	96
Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu	
20 25 30	
ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag	144
Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln	
35 40 45	
gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc	192
Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr	
50 55 60	
atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac	240
Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr	
65 70 75 80	
gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc	288
Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe	
85 90 95	
tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca	336
Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro	
100 105 110	
gag gct ggg ggc cgg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc	384
Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro	
115 120 125	
acc	387
Thr	

10 <210> 12
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 12

ES 2 600 491 T3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30
 Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45
 Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
 50 55 60
 Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
 100 105 110
 Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Thr

<210> 13
 <211> 330
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(330)

<400> 13

gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48
 Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30
 ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc 144
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag 192
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60
 gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt 240
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg 288
 15 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95
 ggc cgg gaa gtc acg tac gag cca ccc cgg aca gcc ccc acc 330
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 100 105 110

<210> 14
 <211> 110
 20 <212> PRT

ES 2 600 491 T3

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 5 100 105 110

<210> 15

<211> 1071

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1071)

15

<400> 15

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag 96
 Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30
 ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag 144
 Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45
 gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc 192

ES 2 600 491 T3

Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr		
50						55					60						
atc	gag	ctc	gtg	aag	aag	ggc	tgc	tgg	cta	gat	gac	ttc	aac	tgc	tac		240
Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr		
65				70					75						80		
gat	agg	cag	gag	tgt	gtg	gcc	act	gag	gag	aac	ccc	cag	gtg	tac	ttc		288
Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Phe		
				85				90						95			
tgc	tgc	tgt	gag	ggc	aac	ttc	tgc	aac	gag	cgc	ttc	act	cat	ttg	cca		336
Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His	Leu	Pro		
			100					105					110				
gag	gct	ggg	ggc	ccg	gaa	gtc	acg	tac	gag	cca	ccc	ccg	aca	gcc	ccc		384
Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Pro		
		115						120					125				
acc	gga	ggg	gga	gga	tct	gtc	gag	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cca	cct		432
Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro		
	130						135					140					
gtg	gca	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc		480
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr		
145					150					155					160		
ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg		528
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val		
				165						170					175		
agc	cac	gaa	gac	ccc	gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg		576
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val		
			180						185					190			
gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	cca	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc		624
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser		
		195						200					205				
acg	ttc	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtt	gtg	cac	cag	gac	tgg	ctg		672
Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu		
	210						215					220					
aac	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	cca	gcc		720
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala		
225						230					235				240		
ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	acc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca		768
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		
				245						250				255			
cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag		816
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln		
			260					265						270			
gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc		864
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
		275						280					285				
gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	aca		912

ES 2 600 491 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300

cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc 960
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1008
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1056
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350

ctg tct ccg ggt aaa 1071
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 16
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 16

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30

Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45

Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
 50 55 60

Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 65 70 75 80

Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
 100 105 110

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 130 135 140

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 145 150 155 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 165 170 175

10

ES 2 600 491 T3

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 195 200 205

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 17
 <211> 1014
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1014)

<400> 17

gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48
 Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15

acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30

ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc 144
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45

gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag 192

15

ES 2 600 491 T3

Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln		
50						55					60						
gag	tgt	gtg	gcc	act	gag	gag	aac	ccc	cag	gtg	tac	ttc	tgc	tgc	tgt		240
Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys		
65					70					75					80		
gag	ggc	aac	ttc	tgc	aac	gag	cgc	ttc	act	cat	ttg	cca	gag	gct	ggg		288
Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly		
			85						90						95		
ggc	ccg	gaa	gtc	acg	tac	gag	cca	ccc	ccg	aca	gcc	ccc	acc	gga	ggg		336
Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Gly		
			100					105					110				
gga	gga	tct	gtc	gag	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cca	cct	gtg	gca	gga		384
Gly	Gly	Ser	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly		
		115						120					125				
ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc		432
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
		130					135					140					
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa		480
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
145					150					155					160		
gac	ccc	gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat		528
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
				165					170						175		
aat	gcc	aag	aca	aag	cca	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	acg	ttc	cgt		576
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg		
			180						185					190			
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtt	gtg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aag		624
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
			195					200					205				
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag		672
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
		210				215						220					
aaa	acc	atc	tcc	aaa	acc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac		720
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
225					230					235					240		
acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg		768
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
				245					250						255		
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg		816
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
			260					265					270				
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	aca	cct	ccc	atg		864
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met		
			275					280					285				
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac		912

ES 2 600 491 T3

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 290 295 300
 aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 960
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 305 310 315 320
 gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1008
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

ggt aaa 1014
 Gly Lys

<210> 18
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18

Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 130 135 140
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 145 150 155 160
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 165 170 175
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 180 185 190
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 195 200 205

10

ES 2 600 491 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 210 215 220
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 225 230 235 240
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 245 250 255
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 260 265 270
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 275 280 285
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 290 295 300
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 305 310 315 320
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

Gly Lys

5 <210> 19
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 10 100 105 110

10 <210> 20
 <211> 1014
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1014)

20 <400> 20

ES 2 600 491 T3

gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg 1 5 10 15	48
acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg 20 25 30	96
ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu 35 40 45	144
gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln 50 55 60	192
gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys 65 70 75 80	240
gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly 85 90 95	288
ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc gga gga Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly 100 105 110	336
gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Val Ala Gly 115 120 125	384
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 130 135 140	432
tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 145 150 155 160	480
gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 165 170 175	528
aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg 180 185 190	576
gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 195 200 205	624
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag	672

ES 2 600 491 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 210 215 220

aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac 720
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 225 230 235 240

acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg 768
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 245 250 255

acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg 816
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 260 265 270

gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg 864
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 275 280 285

ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac 912
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 290 295 300

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 960
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 305 310 315 320

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1008
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

ggt aaa 1014
 Gly Lys

<210> 21
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95

10

ES 2 600 491 T3

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 130 135 140

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 165 170 175

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 180 185 190

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 195 200 205

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 210 215 220

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 225 230 235 240

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 245 250 255

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 260 265 270

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 275 280 285

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 290 295 300

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 305 310 315 320

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

Gly Lys

<210> 22

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

10 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

ES 2 600 491 T3

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 23
 <211> 217
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Ile Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Gly Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

10

ES 2 600 491 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 24
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

10

ES 2 600 491 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador de bisagra

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(36)

<400> 26

gga ggg gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca
 Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

36

<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador de bisagra

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

ES 2 600 491 T3

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 10 1 5 10 15
 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Glu Ser Lys Thr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 20 1 5 10
 <210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 31
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Gly
 30 <210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 32
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly
 40 <210> 33
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 33

ES 2 600 491 T3

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
245 250 255

ES 2 600 491 T3

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 34
 <211> 426
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp Ile
 1 5 10 15

Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala
 20 25 30

10

ES 2 600 491 T3

Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro
 35 40 45
 Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn
 50 55 60
 Met Leu His Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys
 65 70 75 80
 Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu His Val Gly Lys Val Gly
 85 90 95
 Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu
 100 105 110
 Met Asn Glu Leu Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile Ser Lys Glu Gly
 130 135 140
 Ser Asp Leu Ser Val Val Glu Arg Ala Glu Val Trp Leu Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Val Pro Lys Ala Asn Arg Thr Arg Thr Lys Val Thr Ile Arg Leu Phe
 165 170 175
 Gln Gln Gln Lys His Pro Gln Gly Ser Leu Asp Thr Gly Glu Glu Ala
 180 185 190
 Glu Glu Val Gly Leu Lys Gly Glu Arg Ser Glu Leu Leu Leu Ser Glu
 195 200 205
 Lys Val Val Asp Ala Arg Lys Ser Thr Trp His Val Phe Pro Val Ser
 210 215 220
 Ser Ser Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Lys Ser Ser Leu Asp Val
 225 230 235 240
 Arg Ile Ala Cys Glu Gln Cys Gln Glu Ser Gly Ala Ser Leu Val Leu
 245 250 255
 Leu Gly Lys Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Gly Glu Gly Lys Lys Lys
 260 265 270
 Gly Gly Gly Glu Gly Gly Ala Gly Ala Asp Glu Glu Lys Glu Gln Ser
 275 280 285
 His Arg Pro Phe Leu Met Leu Gln Ala Arg Gln Ser Glu Asp His Pro
 290 295 300
 His Arg Arg Arg Arg Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Lys Val Asn Ile
 305 310 315 320
 Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn
 325 330 335
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly
 340 345 350

ES 2 600 491 T3

Glu Cys Pro Ser His Ile Ala Gly Thr Ser Gly Ser Ser Leu Ser Phe
 355 360 365

His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe
 370 375 380

Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser
 385 390 395 400

Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln
 405 410 415

Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser
 420 425

<210> 35
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 35

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30

Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
 35 40 45

Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60

Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80

Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
 85 90 95

Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110

Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
 115 120 125

Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140

Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160

Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175

Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190

Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205

10

ES 2 600 491 T3

Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220

Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240

Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255

Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 260 265 270

Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 275 280 285

Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300

Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320

Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335

Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350

Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365

Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

<210> 36
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 36

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Ile Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Gly Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

10

ES 2 600 491 T3

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

5 <210> 37
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ligador de bisagra
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(48)

15 <400> 37
 gga ggg gga gga tct gag cgc aaa tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc 48
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

20 <210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ligador de bisagra
 <400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

30 <210> 39
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ligador de bisagra

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(42)

ES 2 600 491 T3

<400> 39

gga ggg gga gga tct ggt gga ggt ggt tca ggt cca ccg tgc 42
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Cys
 1 5 10

5 <210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213 > Artificial

10 <220>
 <223> Ligador de bisagra

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Cys
 15 1 5 10

<210> 41
 <211> 42
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador de bisagra

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(42)

<400> 41

30 gga ggg gga gga tct ggt gga ggt ggt tca ggt cca ccg gga 42
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Gly
 1 5 10

<210> 42
 <211> 14
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador de bisagra

40 <400> 42

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Gly
 1 5 10

45 <210> 43
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Ligador de bisagra

<220>
 <221> CDS
 55 <222> (1)..(54)

<400> 43

ES 2 600 491 T3

gga ggg gga gga tct gag cgc aaa tgt cca cct tgt gtc gag tgc cca 48
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Pro Pro Cys Val Glu Cys Pro
 1 5 10 15

ccg tgc 54
 Pro Cys

5 <210> 44
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ligador de bisagra
 <400> 44

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Pro Pro Cys Val Glu Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Cys

15 <210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Ligador de bisagra
 <400> 45

25 Gly Pro Ala Ser Gly Gly Pro Ala Ser Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

30 <210> 46
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador de bisagra

35 <400> 46

Gly Pro Ala Ser Gly Gly Pro Ala Ser Gly Cys Pro Pro Cys Val Glu
 1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Pro
 20

40 <210> 47
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 47

ES 2 600 491 T3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 48
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligador de bisagra

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

15 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Ligador de bisagra

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 50

ES 2 600 491 T3

<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Ligador de bisagra

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr
1 5 10 15

10 Gly Pro Pro Cys Pro
20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor IIB de activina estabilizado, en la que dicho polipéptido se selecciona del grupo consistente en:
- (a) un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14;
- 5 (b) un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11, y
- (c) polipéptidos que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.
- 10
2. La proteína de la reivindicación 1, en la que el polipéptido está conectado con al menos un polipéptido heterólogo.
3. La proteína de la reivindicación 2, en la que el polipéptido heterólogo es un dominio Fc de IgG.
4. La proteína de la reivindicación 2, en la que el polipéptido heterólogo está conectado con el polipéptido mediante una secuencia ligadora.
- 15
5. La proteína de la reivindicación 4, en la que la secuencia ligadora se selecciona del grupo consistente en las secuencias expuestas en las: SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.
6. La proteína de la reivindicación 3, en la que la proteína comprende un polipéptido seleccionado del grupo consistente en:
- 20
- (a) un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18;
- (b) un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11; y
- 25
- (c) polipéptidos que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.
7. Una proteína aislada consistente en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10.
8. Una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor IIB de activina estabilizado (svActRIIB), en la que dicho polipéptido se selecciona del grupo consistente en:
- 30
- (a) un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona del grupo consistente en W e Y y la sustitución en la posición 44 es T;
- 35
- (b) un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO:2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona del grupo consistente en W e Y, y la sustitución en la posición 44 es T;
- 40
- (c) un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO:2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona del grupo consistente en W e Y, y la sustitución en la posición 44 es T;
- 45
- (d) un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución en la posición 28 se selecciona del grupo consistente en W e Y y la sustitución en posición 44 es T;
- (e) un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con uno cualquiera de (a) a (d), excepto por una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 2 y una sola sustitución aminoacídica en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 2, en la

que la sustitución en la posición 28 se selecciona del grupo consistente en W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.

- 9.** Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 8.
- 5 **10.** Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido seleccionado de grupo consistente en.
- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14;
- 10 (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2; y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11; y
- 15 (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.
- 11.** La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10, en la que el polinucleótido tiene la secuencia seleccionada del grupo consistente en la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 3, 5, 11 y 13 o su complemento.
- 12.** La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10, en la que el polinucleótido comprende además un polinucleótido que codifica al menos una proteína heteróloga.
- 20 **13.** La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 12, que comprende un polinucleótido seleccionado de grupo consistente en:
- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido consistente en la secuencia expuesta en el grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18;
- 25 (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11; y
- 30 (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con (a), en la que el polipéptido tiene W o Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO:2 y T en la posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO:2, y en la que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.
- 14.** La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13, en la que el polinucleótido tiene la secuencia seleccionada del grupo consistente en la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 7, 9, 15 y 17, o su complemento.
- 35 **15.** La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10, en la que el polinucleótido está ligado operativamente con una secuencia reguladora transcripcional o traduccional.
- 16.** Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10.
- 17.** Una célula hospedadora que comprende el vector recombinante de la reivindicación 16.
- 18.** La célula hospedadora de la reivindicación 17, en la que la célula hospedadora es una célula de mamífero.
- 40 **19.** Un método de producción de una proteína svActRIIB que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 17 en condiciones que promuevan la expresión de la proteína, y recuperar la proteína.
- 20.** Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 21.** La composición de la reivindicación 20 para uso como un medicamento.
- 45 **22.** La composición de la reivindicación 20 para uso en un método de tratamiento de consunción muscular o un trastorno metabólico seleccionado de diabetes, obesidad, hiperglicemia y pérdida ósea en un sujeto necesitado de dicho tratamiento.
- 23.** La composición para uso según la reivindicación 22, en la que la consunción muscular es debida a una enfermedad de consunción muscular seleccionada de distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad

pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca crónica, caquexia por cáncer, SIDA, insuficiencia renal, uremia, artritis reumatoide, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia orgánica, síndrome del túnel carpiano, privación de andrógenos, lesión por quemadura, diabetes y consunción muscular debida a un reposo en cama prolongado, lesión de médula espinal, apoplejía, fractura ósea, envejecimiento o exposición a microgravedad.

5 **24.** La composición de la reivindicación 20 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad en la que se sobreexpresa activina en un sujeto necesitado de dicho tratamiento, y en la que la enfermedad es cáncer.

10 **25.** El vector de la reivindicación 16 para uso en un método de tratamiento de consunción muscular o un trastorno metabólico seleccionado de diabetes, obesidad, hiperglicemia y pérdida ósea o un cáncer en que se sobreexpresa activina en un sujeto necesitado de dicho tratamiento, en el que el vector es capaz de dirigir la expresión de un polipéptido svActRIIB en el sujeto.

26. La composición para uso según la reivindicación 24 o el vector para uso según la reivindicación 25, en los que el cáncer es cáncer de ovario.

15 **27.** Uso de la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un método de aumento de la masa muscular magra o de aumento de la relación de masa muscular magra a masa grasa, en el que el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

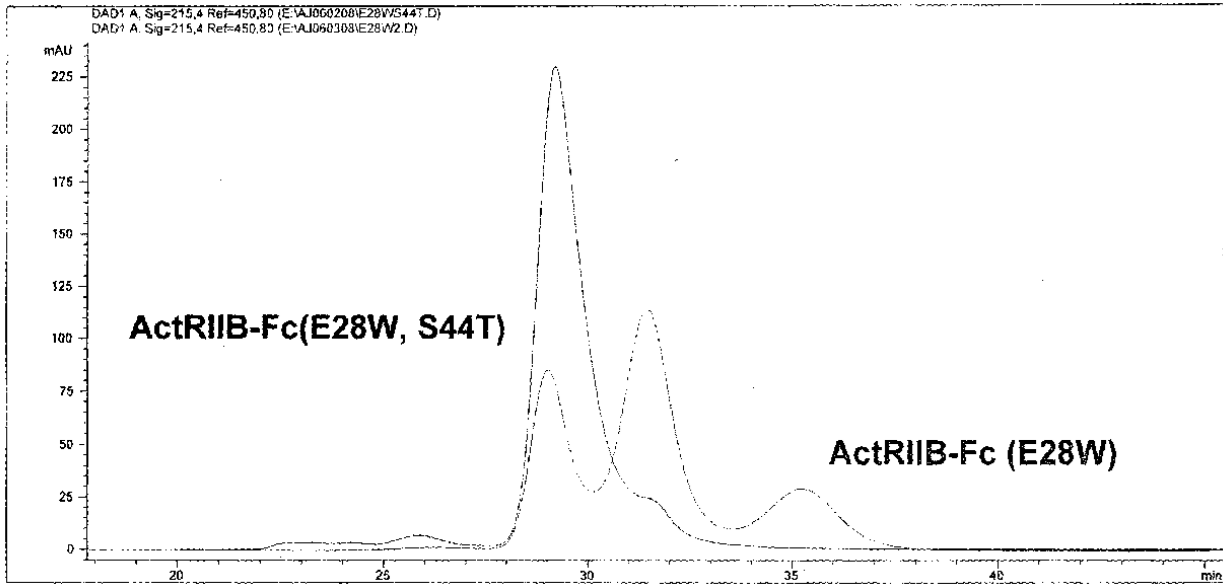


FIGURA 1

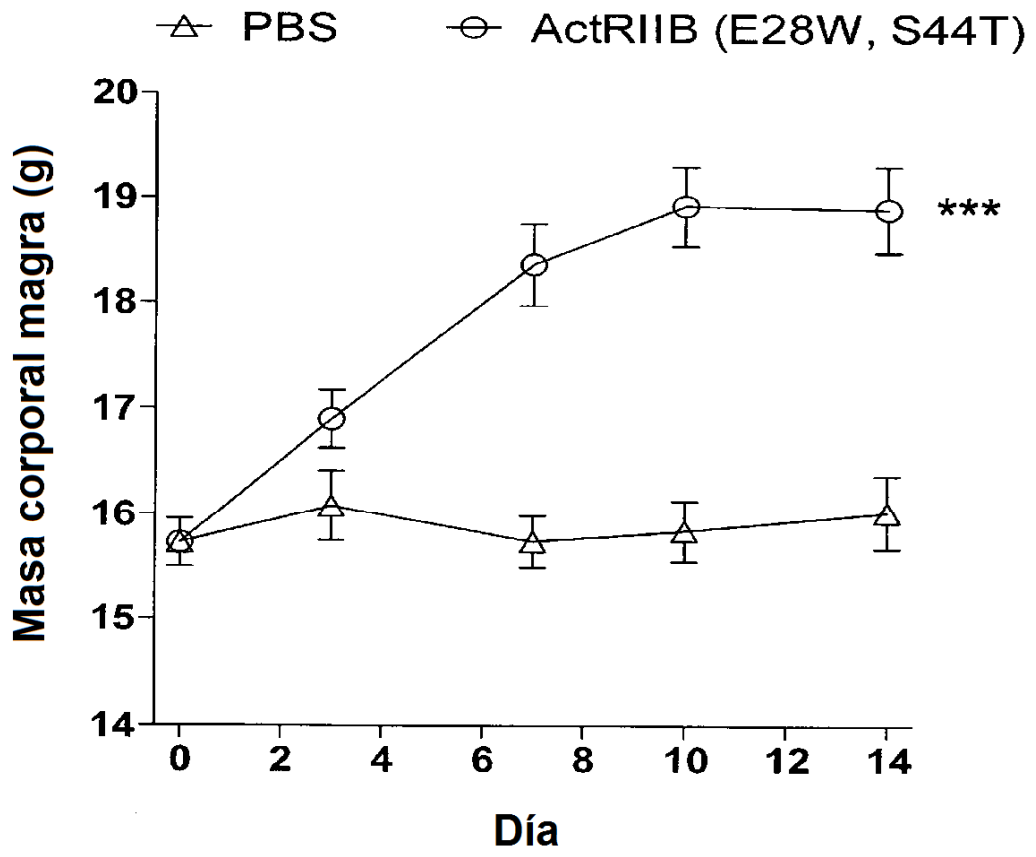


FIGURA 2

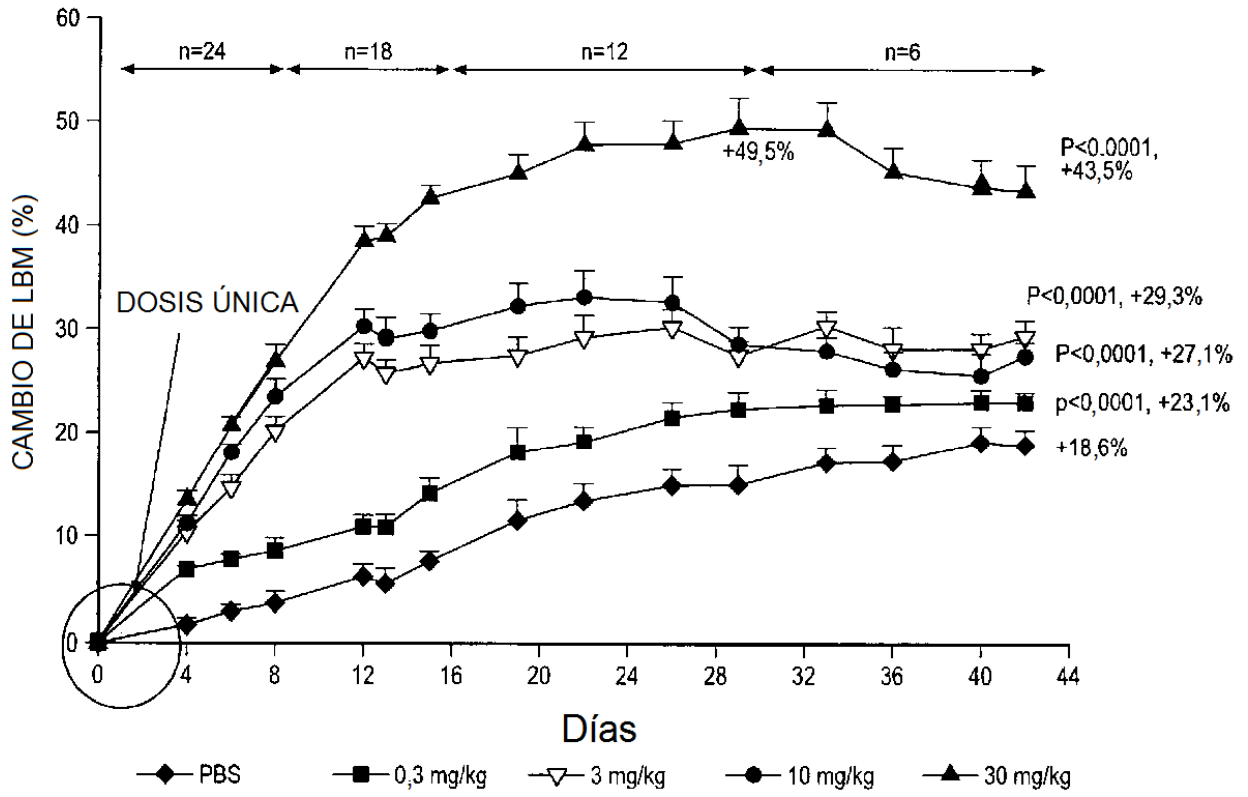


FIGURA 3