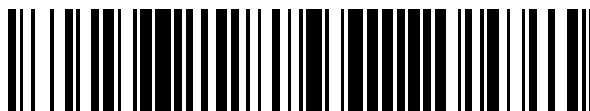


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 957**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/028384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14152955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14722458 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2970415**

54 Título: **Proteínas de fusión de apelina y usos de las mismas**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361786172 P

20.11.2013 US 201361906567 P

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

12.04.2019

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

**777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**STEVIS, PANAYIOTIS;
GROMADA, JESPER y
MURPHY, ANDREW**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 708 957 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de apelina y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a proteínas de fusión diseñadas con componentes multimerizantes, tales como dominios Fc de inmunoglobulina humana, fusionadas al extremo N o al extremo C de péptidos apelina. Las proteínas recombinantes de la invención y las composiciones de las mismas son útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, isquemia-reperfusión, diabetes y otras terapias relacionadas con la apelina.

Antecedentes de la invención

La preproapelina es una proteína de 77 aminoácidos expresada en el SNC humano y en los tejidos periféricos, por ejemplo, pulmones, corazón y glándula mamaria. Se demostró que los péptidos que comprenden fragmentos del extremo C de tamaño variable del péptido apelina activan el receptor acoplado a la proteína G, el receptor APJ (Habata, y col., 1999, *Biochem Biophys Acta* 1452:25-35; Hosoya, y col., 2000, *JBC*, 275 (28):21061-67; Lee, y col., 2000, *J Neurochem* 74:34-41; Medhurst, y col., 2003, *J Neurochem* 84:1162-1172). Muchos estudios indican que los péptidos apelina y sus análogos transmiten acciones cardiovasculares a través de su interacción con el receptor APJ (también conocido como APLNR), tales como la vasodilatación dependiente del endotelio (Tatemoto y col., 2001, *Regul Pept* 99:87-92), actividades inotrópicas positivas (Szokodi y col., 2002, *Circ Res* 91:434-440; Maguire, y col., 2009, *Hypertension* 54:598-604, publicación electrónica previa a la impresión el 13 de julio de 2009) e isquemia y reperfusión regional del miocardio (Pisarenko, y col., 2013, *J Pharmacol Pharmacother*. "Effects of structural analogues of apelin-12 in acute myocardial infarction in rats", publicación electrónica previa a la impresión). La apelina-13, en particular, es un potente inótropo que podría proporcionar un tratamiento para la insuficiencia cardíaca al aumentar la contractilidad del corazón (Dai, y col., 2006, *Eur J Pharmacol* 553(1-3): 222-228; Maguire, y col., 2009, *Hypertension*. 54:598-604).

El perfil transcripcional del tejido ventricular prequirúrgico y postquirúrgico en pacientes humanos reveló que el APLNR fue el gen más significativamente regulado al alza (Chen y col., 2003, *Circulation*, 108:1432-39). Los estudios de inactivación de la apelina (apelina^{-/-}) y APJ (APJ^{-/-}) en ratones sugieren que la falta de una vía de apelina-APJ endógena conduce a una menor capacidad para responder al esfuerzo cardiovascular, tal como el ejercicio (Charo y col., 2009, *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 297: H1904-1913).

La apelina también se ha presentado en la regulación de la insulina y los mecanismos de la diabetes y los trastornos relacionados con la obesidad. En modelos de obesidad en ratones, la apelina es liberada desde los adipocitos y es regulada al alza directamente por la insulina (Boucher, y col., 2005, *Endocrinol* 146:1764-71). Los ratones con inactivación de apelina demuestran una sensibilidad a la insulina disminuida (Yue, y col., 2010, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E59-E67).

Los agentes moduladores de APLNR también fueron útiles en el tratamiento del VIH, ya que los péptidos apelina sintéticos inhibieron la entrada del VIH-1 en células que expresan CD4-APLNR (Cayabyab, M., y col., 2000, *J. Virol.* 74: 11972-11976). Además, los inhibidores de APLNR, es decir, capaces de bloquear la angiogénesis patológica, pueden ser útiles para inhibir el crecimiento tumoral o la vascularización en la retina (Kojima, Y. y Quertermous, T., 2008, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 28; 1687-1688; Rayalam, S. y col. 2011, *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6 (3):367-72). La neuroprotección de la apelina también se observa cuando la apelina-13, apelina-17 y apelina-36 actúan a través de vías de señalización para promover la supervivencia neuronal (Cheng, B, y col., 2012, *Peptides* 37(1):171-3).

Los agentes de unión a APLNR son útiles para mejorar las enfermedades cardiovasculares, así como el cáncer y la diabetes, entre otras enfermedades relacionadas con la apelina. Dado que los péptidos apelina se eliminan rápidamente de la circulación y tienen una semivida plasmática corta de no más de ocho minutos (Japp, y col., 2008, *J of Amer College Cardiol*, 52(11):908-13), la apelina se administra actualmente de forma continua para poder observar un efecto terapéutico.

El documento WO 2011/140086 divulga una proteína de tipo anticuerpo basada en el décimo dominio de tipo III de fibronectina (¹⁰F_n3) que se une a la albúmina sérica. El documento WO 2012/125408 proporciona composiciones y procedimientos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con apelina. Específicamente, el documento WO 2012/125408 se refiere a una forma pegilada de apelina para proporcionar vida circulante prolongada y efectos inotrópicos y, por lo tanto, trata de manera eficaz enfermedades o trastornos asociados con la apelina. Nishimura y col. (2001) *J. Chem. Soc.*, 1960-1968 describe un nuevo sistema para la preparación de péptidos recombinantes biológicamente activos. El documento WO 02/36762 divulga un procedimiento para producir eficazmente un péptido objetivo. Murza y col. (2012) *ChemMedChem*, 7, 318-325 divulgan la síntesis de análogos de apelina-13 modificados en posiciones seleccionadas con aminoácidos no naturales. Huang (2009) *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 692-699 revisa las proteínas de fusión Fc que han sido aprobadas para su uso en la clínica y en ensayos clínicos. Carter y col. (2011) *Experimental Cell Research*, 317, 1261-1269 proporciona una introducción a la

terapéutica de proteínas. Sato y col. (2006) *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 638-642 analizan los péptidos terapéuticos y los avances tecnológicos que llevan a los péptidos a su desarrollo. El documento WO 2014/099984 divulga análogos agonistas del receptor de APJ que tienen una estabilidad incrementada en relación con la apelina de tipo salvaje 13 y métodos para usar los análogos.

5 Existe una necesidad en la técnica de agentes de unión a apelina mejorados como agentes terapéuticos, particularmente aquellos que tienen una semivida prolongada, mientras que mantienen la actividad de unión a APLNR.

10 Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona proteínas de fusión de apelina, tales como la apelina fusionada con un dominio Fc, diseñadas para administrar péptidos apelina biológicamente activos. En particular, las proteínas de fusión de apelina tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con los péptidos apelina de tipo salvaje mientras que mantienen la actividad de APLNR.

15 Un aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido que comprende un péptido apelina fusionado a un componente multimerizante. En un aspecto de la divulgación, el componente multimerizante comprende una secuencia de aminoácidos que contiene al menos un residuo de cisteína. En otro aspecto de la descripción, el componente multimerizante comprende una secuencia de aminoácidos que contiene una cremallera de leucina, un motivo hélice-bucle, un motivo de hélice superenrollada o un dominio derivado de inmunoglobulina. En otro aspecto de la divulgación, el componente multimerizante comprende una secuencia de aminoácidos que contiene un dominio Fc.

25 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un polipéptido que comprende un péptido apelina fusionado con un dominio Fc, un fragmento de un dominio Fc, o una variante de un dominio Fc. En algunos casos, el polipéptido puede ser parte de una estructura de orden superior, tal como una proteína o un complejo multimérico. En algunos aspectos de la divulgación, el péptido apelina se fusiona con el dominio Fc, o fragmento del mismo, a través de uno o más enlaces peptídicos. En otros aspectos, el péptido apelina se fusiona con el extremo C de dicho dominio Fc, o el péptido apelina se fusiona con el extremo N de dicho dominio Fc, o fragmento de los mismos.

Específicamente, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un péptido apelina fusionado con un dominio Fc de IgG humano, en el que el extremo N del péptido apelina se fusiona con el extremo C del dominio Fc a través de uno o más enlaces Gly-Ser,

35 en el que el péptido apelina se selecciona del grupo que consiste en apelina42-77 (apelina-36), apelina61-77 (apelina-17), apelina63-77 (apelina-15), apelina64-77 (apelina-14), apelina65-77 (apelina-13), apelina66-77 (apelina-12), apelina67-77 (apelina-11), apelina68-77 (apelina-10), apelina73-77 (apelina-5), apelina61-76 (apelina-K16P), apelina61-75 (apelina-K15M), apelina61-74 (apelina-K14P), apelina-F13A, apelina65-76, apelina65-75, apelina66-76, apelina67-76, apelina66-75, apelina 67-75, [Pyr¹]Apelina-13, SEQ ID NO: 38 (apelina-13+5G), SEQ ID NO: 42 (apelina-13+R), SEQ ID NO: 43 (apelina-13+S) y SEQ ID NO: 44 (apelina-13+H).

En una realización, el dominio Fc de cualquiera de las proteínas de fusión de apelina descritas en el presente documento comprende un dominio CH2 de inmunoglobulina o un dominio CH3 de inmunoglobulina. En otra realización, el dominio Fc comprende un dominio CH2 y CH3 de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el dominio Fc se selecciona del grupo que consiste en el dominio CH2 y CH3 de IgG1, el dominio CH2 y CH3 de IgG4, el dominio CH2 de IgG1 y el dominio CH3 de IgG4, y el dominio CH2 de IgG4 y el dominio CH3 de IgG1. En otras realizaciones, el dominio Fc comprende un dominio bisagra de IgG. En otras realizaciones más, el dominio Fc comprende un dominio bisagra de IgG seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.

50 En otra realización, el polipéptido comprende un polipéptido de fusión monomérico capaz de formar un dímero. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión forma al menos un enlace disulfuro con un segundo polipéptido.

En otro aspecto relacionado, la descripción proporciona una molécula de unión al receptor de apelina (APNLR) que comprende: un componente peptídico de apelina, un dominio Fc de IgG humana y al menos un componente enlazador. En algunos aspectos de la divulgación, la molécula de unión al receptor de apelina (APNLR) es un agonista de APLNR, y en otros casos la molécula de unión al receptor de apelina (APNLR) es un antagonista de APLNR.

60 En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un polipéptido de fusión de apelina o una molécula de unión al receptor de apelina que tiene una semivida de plasma o suero *in vivo* de al menos aproximadamente 1 hora, o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más horas.

En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión de apelina de la invención comprende un péptido apelina seleccionado del grupo que consiste en apelina 42-77 (apelina-36), apelina61-77 (apelina-17), apelina 63-77 (apelina-15), apelina 64-77 (apelina-14), apelina65-77 (apelina-13), apelina66-77 (apelina-12), apelina67-77 (apelina-

11), apelina68-77 (apelina-10), apelina73-77 (apelina-5), apelina61-76 (apelina-K16P), apelina61-75 (apelina-K15M), apelina61-74 (apelina-K14P), apelina-F13A, apelina65-76, apelina65-75, apelina66-76, apelina67-76, apelina66-75, apelina 67-75, y [Pyr¹]Apelina-13.

- 5 En ciertos aspectos, el polipéptido de fusión de apelina o la molécula de unión al receptor de apelina es una proteína estable en suero. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido tiene una identidad de secuencia del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor con la secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41.

- 15 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un polipéptido recombinante, comprendiendo el polipéptido N'-P1_m-X1_n-X2-X3-P2-A1-C', en donde: N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido; P1 es un enlazador peptídico; X1 comprende un dominio bisagra de IgG; X2 comprende un dominio CH2 de IgG; X3 comprende un dominio CH3 de IgG, P2 es un enlazador peptídico; y A1 es una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido de apelina humano, o un fragmento o derivado del mismo; en donde m = 0 o 1, y n = 0 o 1.

- 20 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un polipéptido recombinante, comprendiendo el polipéptido N'-A1-P2-X1_n-X2-X3-C', en donde: N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido; A1 es una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido apelina humano, o un fragmento o derivado del mismo; P2 es un enlazador peptídico; X1 comprende un dominio bisagra de IgG; X2 comprende un dominio CH2 de IgG; y X3 comprende un dominio CH3 de IgG; en donde n = 0 o 1.

- 25 En un segundo aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica cualquier polipéptido de fusión de apelina de la invención. La molécula de ácido nucleico puede tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41.

- 30 En un tercer aspecto, la invención proporciona vectores y células que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de fusión de apelina de la invención. Los vectores pueden codificar una molécula de ácido nucleico unida a una secuencia peptídica de señal.

- 35 La divulgación también proporciona vectores que codifican proteínas de fusión de apelina que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal. La divulgación proporciona además vectores que codifican proteínas de fusión de apelina que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un enlazador peptídico fusionado con el extremo C de un péptido de señal colocado aguas arriba de la proteína de fusión.

- 40 La divulgación también proporciona un procedimiento para determinar la actividad APLNR de una molécula de prueba, contactando células que expresan APLNR, con la proteína de fusión de apelina en las mismas condiciones de prueba que la molécula de prueba, para determinar si la molécula de prueba es un agonista de APLNR o un antagonista de APLNR.

- 45 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para determinar la activación de un receptor de APLN (APLNR) que comprende: (a) poner en contacto las células que expresan el APLNR con una molécula de prueba, en condiciones que permiten la activación del APLNR, (b) medir la actividad del APLNR, (c) poner en contacto por separado las células que expresan el APLNR con una proteína de fusión de apelina de la invención en las mismas condiciones que en la etapa (a), (d) medir la actividad del APLNR de las células en la etapa (c) de la misma manera que en la etapa (b), en donde la medición de la actividad del APLNR en la etapa (b) en comparación con la medición de la actividad del APLNR en la etapa (d) determina que la molécula de prueba activa el APLNR.

- Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento de elaboración de una proteína de fusión que comprende apelina, comprendiendo dicho método: (a) transfectar una célula huésped con una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal, fusionado con i) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio Fc de IgG humana unida a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido apelina, en el extremo N de dicho péptido apelina, o ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido apelina unido a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio Fc de IgG humana, en el extremo N de dicho dominio Fc, y (b) producir la proteína de fusión expresando la molécula de ácido nucleico de (a) en la célula huésped. La divulgación proporciona células huésped que secretan las proteínas de fusión en el medio de cultivo celular.

- 60 En otro aspecto más, la invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención para uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con apelina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración del polipéptido a dicho sujeto, en el que la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardíaca

descompensada aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, cardiomiopatía, isquemia, lesión por isquemia/reperfusión, hipertensión pulmonar, diabetes, obesidad, cáncer, enfermedad metastásica, homeostasis por fluidos, angiogénesis patológica, retinopatía, fibrosis e infección por VIH.

- 5 La invención proporciona además kits que comprenden uno o más recipientes llenos con al menos un polipéptido de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1A muestra componentes de una proteína de fusión hFc-apelina, como la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. La secuencia SEQ ID NO: 2 consiste en (desde el extremo N hasta el extremo C) Fc de IgG1 humana (subrayada), enlazador de péptidos de repetición G4S (en cursiva) y Apelina-13 (subrayado doble). La Figura 1B representa una proteína de fusión de Fc-apelina secretada y sus componentes en forma de homodímero.
- 15 La Figura 2A representa los componentes de una proteína de fusión de Apelina-hFc, tal como la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. La secuencia SEQ ID NO: 4 consiste en (desde el extremo N hasta el extremo C) Apelina-13 (doble subrayado), enlazador de péptidos de repetición G4S (en cursiva) y Fc de IgG1 humana (subrayado). La Figura 2B representa una proteína de fusión de Apelina-Fc secretada y sus componentes en forma de homodímero.
- 20 La Figura 3A ilustra la migración de las proteínas de fusión Fc Apelina y el control de la escala de proteínas en un gel de SDS-PAGE. Carril 1 = medidas de marcadores de proteínas (31 y 38 kD); Carril 2 = hFc-apelina-13 (SEQ ID NO: 2); Carril 3 = proteína apelina13-hFc (SEQ ID NO: 4); Carril 4 = hFc solo. La Figura 3B ilustra la reactividad de 10 ng o 100 ng de proteína hFc-apelina13 o apelina13-hFc aislada en una transferencia Western con anticuerpo anti-apelina.
- 25 La Figura 4 representa la curva de dosis-respuesta y las concentraciones máximas medias (EC50) de cada uno de los siguientes ligandos: apelina-13 (-●-), hFc-apelina13 (-■-), o apelina13-hFc (-◆-) en un ensayo CRE-luc mediante la medición de la respuesta de cAMP inducida por forskolina en células que expresan APJ (APNLR). La Figura 5 representa la curva de dosis-respuesta y las concentraciones máximas medias (EC50) de cada uno de los siguientes ligandos: apelina-13 (-●-), hFc-apelina13 (-■-), apelina13-hFc (-▲-), o hFc solo (-▼-) en un ensayo de β-arrestina.
- 30 La Figura 6 representa la curva de dosis-respuesta y las concentraciones máximas medias (EC50) del ensayo p-ERK normalizado de hFc-apelina13 (-●-) o apelina13-hFc (-■-), en comparación con hFc (-▲-), mostrando la activación de las células que expresan APNLR por ambos ligandos. X
- 35 La Figura 7A muestra la estabilidad de 2,8 mg/kg de apelina13-hFc (-■-) en suero de ratones C57/Bl6 a los que se administró por vía subcutánea, alcanzando niveles de aproximadamente 10 µg/ml durante hasta 48 horas, en comparación con los niveles de hFc solo (-●-).
- La Figura 7B muestra la estabilidad de 5 mg/kg de hFc-apelina13 (-●-) en suero de ratones C57/Bl6 a los que se administró por vía subcutánea, alcanzando 3 µg/ml a las 24 h y disminuyendo gradualmente a 1 µg/ml a los 14 días aproximadamente.
- 40

Descripción detallada de la invención

- 45 Debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos particulares y a las condiciones experimentales descritas, ya que dichos procedimientos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria descriptiva tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

- 50 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a “un procedimiento” incluye uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer la presente divulgación.

- 55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente solicitud tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Si bien en la práctica de la presente invención se puede utilizar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación, se describen procedimientos y materiales particulares.

60 Proteínas de fusión

- El término “inmunoglobulina” (Ig) se refiere a una clase de glicoproteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) y un par de cadenas pesadas (H), que pueden estar interconectadas entre sí por enlaces de disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Cada cadena pesada comprende generalmente una región variable de cadena pesada (abreviada en el
- 65

presente documento como V_H o VH) y una región constante de cadena pesada (C_H o CH). La región constante de la cadena pesada comprende generalmente tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Los dominios CH1 y CH2 están enlazados por una bisagra. La parte Fc comprende al menos los dominios CH2 y CH3.

5 Generalmente, la numeración de los residuos de aminoácidos de las inmunoglobulinas se realiza de conformidad con IMGT, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) o mediante el sistema de numeración EU de Kabat (también conocido como "numeración EU" o "índice EU"), por ejemplo, tal como en Kabat, E.A. y col. *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5ª ed. US Department of Health and Human Services, publicación de NIH n.º 91-3242 (1991).

10 Tal como se usa en la memoria descriptiva, un "componente multimerizante" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo componente multimerizante de estructura igual o similar. Por ejemplo, un componente multimerizante puede ser un polipéptido que comprende un dominio C_{H3} de inmunoglobulina. Un ejemplo no limitante de un componente multimerizante es una parte Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipos. En ciertos aspectos de la divulgación, el componente multimerizante es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud que contiene al menos un residuo de cisteína. En otros aspectos de la divulgación, el componente multimerizante es un residuo de cisteína o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios multimerizantes incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo hélice-bucle o un motivo hélice superenrollada.

25 El término "Fc" se refiere a una parte de una región constante de cadena pesada que comprende al menos los dominios CH2 y CH3 que generalmente se unen a un receptor de Fc, por ejemplo, un FcγR, a saber, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) o un FcRn, es decir, un receptor de Fc neonatal. Si la región CH2 y CH3 contiene delecciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que lo hacen incapaz de unirse a cualquier receptor Fc, se considera que la región CH2 y CH3 no es funcional en términos de su función biológica típica.

30 La frase "proteínas de fusión", y específicamente "proteínas de fusión de apelina", incluye polipéptidos recombinantes y proteínas derivadas de apelina que se han diseñado para contengan un componente multimerizante tal como se describe en el presente documento.

35 La frase "proteínas de fusión Fc", y específicamente las proteínas de fusión "apelina-Fc" o "Fc-apelina", incluye polipéptidos recombinantes y proteínas derivadas de la apelina que se han diseñado para contener un fragmento de Fc tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una "proteína de fusión Fc de apelina" incluye una proteína química que comprende una secuencia de aminoácidos de un péptido de apelina o un análogo fusionado a una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de Ig, ya sea en el extremo N o en el extremo C, con o sin enlazadores peptídicos. Los ejemplos de péptidos usados en las proteínas de fusión son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dumont, y col., 2006, *Biodrugs* 20(3):150-160). Las proteínas de fusión Fc también se conocen en la técnica como inmunoadhesinas.

45 La frase "fusionado a", como se usa en este documento, significa (pero no se limita a) un polipéptido formado por la expresión de un gen quimérico creado mediante la combinación de más de una secuencia, generalmente mediante la clonación de un gen en un vector de expresión en un marco con un segundo gen tal que los dos genes codifican un polipéptido continuo. Además de elaborarse mediante tecnología recombinante, las partes de un polipéptido pueden "fusionarse" entre sí mediante una reacción química u otros medios conocidos en la técnica para elaborar polipéptidos personalizados.

50 El término "proteína" pretende incluir estructuras cuaternarias, estructuras ternarias y otras macromoléculas complejas compuestas de al menos un polipéptido. El término "proteína" incluye polipéptido.

55 Tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido" es una cadena polimérica lineal única de aminoácidos unida por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. El término "proteína" también se puede usar para describir un polipéptido grande, como una proteína de siete dominios transmembranales.

60 Los polipéptidos de la invención comprenden secuencias de aminoácidos que se derivan de un dominio de inmunoglobulina. Una secuencia polipeptídica o de aminoácidos "derivada de" una proteína o polipéptido designado se refiere al origen del polipéptido. Tal como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase o subclase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

65 La frase "cadena pesada" o "cadena pesada de inmunoglobulina (Ig)", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de la región constante de la cadena pesada de Ig de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) y cuatro regiones marco (FR),

a menos que se especifique lo contrario. Los fragmentos de dominios variables de cadena pesada incluyen CDR, o CDR y FR. Una región constante (CH) de cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable, del extremo N al extremo C: un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada, por ejemplo, en una proteína de unión a antígeno, incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que puede expresarse en una célula y secretarse de esta, y que comprende al menos una CDR.

Los procedimientos de trampa de secreción autóloga basados en citometría de flujo (FASTR), que utilizan un receptor de Fc γ humano unido a la membrana (hFc γ R) para capturar las proteínas secretadas de manera conjunta, se pueden usar para aislar rápidamente los clones de alta expresión que expresan o secretan un anticuerpo o una proteína de fusión Fc. (Véase el documento US20090137416 A1). Tales clones de alta expresión pueden emplearse para aislar células que expresan proteínas que comprenden una proteína de fusión Fc tal como se describe en el presente documento. Los procedimientos FASTR pueden utilizarse para seleccionar y aislar directamente células que expresan cualquier polipéptido recombinante o proteína de fusión Fc de la invención.

El término "bisagra", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir la región de residuos de aminoácidos consecutivos que conectan el extremo C del dominio CH1 al extremo N del dominio CH2 de una inmunoglobulina. Varios aminoácidos del extremo N del dominio CH2, que están codificados por el exón de CH2, también se consideran parte de la "bisagra inferior". Sin estar limitados por ninguna teoría, los aminoácidos de la región bisagra de IgG1, IgG2 e IgG4 se han caracterizado por comprender 12-15 aminoácidos consecutivos codificados por un exón de bisagra distinto y varios aminoácidos del extremo N del dominio CH2 (codificados por el exón CH2) (Brekke, OH, y col., 1995, *Immunology Today* 16 (2):85-90). Por otro lado, IgG3 comprende una región de bisagra que consta de cuatro segmentos: un segmento superior que se parece a la región de bisagra de IgG1 y 3 segmentos que son repeticiones de aminoácidos idénticos únicos para IgG3.

Los residuos de aminoácidos derivados de los dominios de Ig, tales como la IgG humana, se identifican en el presente documento mediante el sistema de numeración EU de Kabat, también conocido como "numeración EU" o "índice EU" (según Kabat, EA y col. *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 5ª ed., D US Department of Health and Human Services, Publicación NIH n.º 91-3242, 1991, y actualizada según los gráficos científicos de IMGT®, IMGT®, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics®, [http:// www. imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html), creado el 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013).

Por ejemplo, la numeración EU para los aminoácidos de la bisagra de IgG1 humana y la convención de numeración única de IMGT correspondiente, y la convención de numeración de Kabat (según Kabat, E.A. y col., 1991, y gráficos científicos de IMGT® *supra*) se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: numeración de la bisagra de IgG1

Aminoácidos IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración única IMGT para la bisagra	Numeración EU	Numeración de Kabat
(E)	1	216	226
P	2	217	227
K	3	218	228
S	4	219	232 ^a [229] ^b
C	5	220	233 ^a [230] ^b
D	6	221	234 ^a [232] ^b
K	7	222	235
T	8	223	236
H	9	224	237
T	10	225	238
C	11	226	239
P	12	227	240
P	13	228	241
C	14	229	242
P	15	230	243

Tabla 2: numeración de la bisagra de dominio C de IgG1

Aminoácidos IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración única IMGT para la bisagra	Numeración EU	Numeración de Kabat
(A)	1,6	231	244

Aminoácidos IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración única IMGT para la bisagra	Numeración EU	Numeración de Kabat
P	1,5	232	245
E	1,4	233	246
L	1,3	234	247
L	1,2	235	248
G	1,1	236	249

Los aminoácidos resultantes de la unión del exón se muestran entre paréntesis.
^a numeración según el último cuadro científico actualizado de IMGT
^b numeración según el índice EU tal como se presentó originalmente en Kabat, EA, y col. 1991
Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P. y col., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. y col. PNAS EE.UU., 63:78-85 (1969).

En un aspecto, las proteínas de fusión Fc comprenden un dominio Fc o cualquier fragmento del dominio Fc o cualquier variante del dominio Fc. En algunos aspectos, el dominio Fc comprende un dominio CH2 de Ig y un dominio CH3 de Ig, o un fragmento o variante de los mismos. En otros aspectos, el dominio Fc comprende un dominio bisagra de Ig, o un fragmento o variante del mismo, un dominio CH2 de Ig o un fragmento o variante del mismo y un dominio CH3 de Ig o un fragmento o variante del mismo. En aún otros aspectos, el dominio Fc comprende un dominio de CH1 de Ig o un fragmento o variante del mismo, un dominio de bisagra de Ig o un fragmento o variante del mismo, un dominio CH2 de Ig y un fragmento o variante del mismo, y un dominio CH3 de Ig o un fragmento o variante en esto.

El término "quimérico", tal como se usa en el presente documento, significa que está compuesto de partes de origen diferente. La frase "proteína quimérica", que abarca "polipéptidos quiméricos", incluye un primer polipéptido de aminoácido unido a un segundo polipéptido de aminoácido que normalmente no está enlazado de forma natural. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente como polipéptidos separados o en una disposición diferente en el mismo polipéptido o proteína, y se reúnen en un polipéptido de fusión en una nueva disposición.

El dominio Fc puede ser quimérico, combinando secuencias Fc derivadas de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc quimérico puede comprender parte o la totalidad de una secuencia CH2 derivada de una región de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y parte o la totalidad de una secuencia CH3 derivada de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico también puede contener una región de bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de "bisagra superior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico puede tener una unión al receptor Fc alterada, que a su vez afecta a la función efectora de Fc.

Para ciertas terapias, el dominio Fc puede diseñarse para activar todas, algunas o ninguna de las funciones efectoras normales de Fc, sin afectar las propiedades farmacocinéticas de la proteína de fusión Fc deseada. Por lo tanto, los dominios Fc diseñados mediante ingeniería genética que han alterado la unión del receptor Fc pueden tener efectos secundarios reducidos. Por lo tanto, en una realización, la proteína comprende un dominio Fc quimérico o modificado de otra manera. Para ver un ejemplo de un dominio Fc quimérico, véase la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/759.578, presentada el 1 de febrero de 2013.

La divulgación también proporciona proteínas de fusión Fc de apelina que comprenden secuencias de dominio Fc variantes. Dichos dominios Fc de "variante" y fragmentos de dominio Fc comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje, pero esencialmente funcionan tal como se desea, por ejemplo, exhiben actividad APLNR y prolongan la semivida de la proteína de fusión, tal como se describe en esta memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende un dominio CH2 y CH3 de IgG. En otras realizaciones, el dominio Fc comprende un dominio CH2 y CH3 de IgG1, un dominio CH2 y CH3 de IgG4, un dominio CH2 de IgG1 y un dominio CH3 de IgG4, o un dominio CH2 de IgG4 y un dominio CH3 de IgG1. En algunas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc quimérico que comprende un fragmento seleccionado del grupo que consiste en el dominio CH1, el dominio bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3, en donde el fragmento se deriva de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM. En algunas realizaciones, el dominio Fc quimérico comprende un dominio CH2 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 23. En algunas realizaciones, el dominio Fc quimérico comprende un dominio CH3 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 24. En otra realización, el dominio Fc comprende un dominio CH2-CH3 de IgG quimérico.

En una realización, el dominio Fc comprende un dominio bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una realización, el dominio de bisagra comprende SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22. En otra realización, el dominio Fc comprende un dominio de bisagra quimérico. En otra realización, el dominio Fc

comprende un dominio de bisagra quimérico que comprende un fragmento de bisagra seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 22.

Según ciertos aspectos de la divulgación, se proporcionan proteínas de fusión Fc que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que potencian o disminuyen la unión de proteínas al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente divulgación incluye proteínas de fusión Fc que comprenden una mutación en la región CH2 o CH3 del dominio Fc, en donde la(s) mutación(es) aumenta(n) la afinidad del dominio Fc con FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Dichas mutaciones pueden dar como resultado un aumento de la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitativos de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/I/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En un aspecto, la modificación comprende una modificación de 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación de 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

Por ejemplo, la presente divulgación incluye proteínas de fusión Fc que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Se contemplan todas las combinaciones posibles de las anteriores mutaciones del dominio Fc y otras mutaciones dentro de las proteínas de fusión descritas en el presente documento.

Las modificaciones al dominio Fc de una proteína de fusión Fc pueden conferir una mayor estabilidad, tal como la resistencia a la degradación. Las proteínas de fusión pueden modificarse utilizando técnicas biológicas moleculares ordinarias y química sintética para mejorar su resistencia a la escisión proteolítica o resistencia a la escisión relacionada con los iones metálicos. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen variantes de sustitución elaboradas mediante el intercambio de un aminoácido por otro o la sustitución por residuos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales.

En un aspecto, las proteínas de fusión Fc comprenden un péptido apelina fusionado a un dominio Fc tal como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión Fc de la invención activa el receptor APLNR y tiene una semivida mayor que la de un péptido apelina que no está fusionado a un dominio Fc, tal como una semivida mayor de más de ocho minutos.

Ligando de apelina y receptor de apelina

La apelina se produce endógenamente como un prepropéptido de 77 aminoácidos que se escinde para producir varios fragmentos biológicamente activos más cortos, o péptidos apelina.

Las proteínas de fusión Fc pueden comprender un péptido apelina tal como se describe en el presente documento.

En la invención, el péptido apelina comprende un fragmento o derivado del polipéptido preproapelina (SEQ ID NO: 5) tal como se define en las reivindicaciones.

Los "péptidos apelina" incluyen fragmentos de apelina específicos y derivados conocidos en la técnica, por ejemplo, un péptido apelina que comprende los aminoácidos 6-77, 40-77, 42-77, 43-77, 47-77, 59-77, 61-77, 63-77, 64-77, 65-77, 66-77, 67-77, 73-77, 1-25, 6-25, 42-64, 61-64, 61-74, 61-75, 61-76, 65-76, 65-75, 66-76, 67-76, 66-75, 67-75, 42-58, 42-57, 42-56, 42-55, 42-54, 42-53, o apelina₆₅₋₇₇ piroglutamada ([Pyr¹]Apelina-13), del polipéptido preproapelina (SEQ ID NO: 5). Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6492324, concedida el 10 de diciembre de 2002, y El Messari y col. 2004, *J Neurochem*, 90: 1290-1301. En una realización, el péptido apelina comprende los aminoácidos 65-76, 65-75, 61-77, 63-77, 64-77, 65-77, 66-77, 67-77, 66-76, 67-76, 66-75, 67-75, o 42-77 de SEQ ID NO: 5.

Se ha demostrado en el presente documento que los fragmentos de péptidos apelina, por ejemplo, los péptidos que tienen deleciones en el extremo C conservan sus actividades celulares (véase también El Messari y col. 2004, *J Neurochem*, 90:1290-1301). En el presente documento se muestra que ciertos derivados peptídicos de apelina, tales como los péptidos apelina y las fusiones que tienen uno o más aminoácidos del extremo C adicionales, retienen sus actividades celulares. Otros fragmentos y derivados peptídicos de apelina pueden prepararse mediante tecnología recombinante por parte de un experto en la materia.

En otros aspectos de la divulgación, el péptido apelina se selecciona del grupo que consiste en apelina40-77 (apelina-38), apelina42-77 (apelina-36), apelina43-77 (apelina-35), apelina47-77 (apelina-31), apelina59-77 (apelina-19), apelina61-77 (apelina-17), apelina63-77 (apelina-15), apelina64-77 (apelina-14), apelina65-77 (apelina-13), apelina66-77 (apelina-12, o A12), apelina67-77 (apelina-11), apelina68-77 (apelina-10), apelina73-77 (apelina-5),
5 apelina61-76 (apelina-K16P), apelina61-75 (apelina-K15M), apelina61-74 (apelina-K14P) y [Pyr¹]Apelina-13.

En algunas realizaciones, el péptido apelina se selecciona del grupo que consiste en apelina61-77 (apelina-17; SEQ ID NO: 7), apelina65-77 (apelina-13; SEQ ID NO: 6), apelina-F13A (SEQ ID NO: 29), apelina66-77 (apelina-12, or A12, SEQ ID NO: 32), apelina67-77 (apelina-11; SEQ ID NO: 33), apelina65-76 (SEQ ID NO:30), apelina65-75 SEQ ID NO: 31), apelina67-77 (SEQ ID NO: 6), apelina66-76 (SEQ ID NO: 34), apelina67-76 (SEQ ID NO: 35), apelina 66-75 (SEQ ID NO: 36), apelina 67-75 (SEQ ID NO: 37) y [Pyr¹]Apelina-13.
10

El péptido apelina puede modificarse para minimizar la degradación y mejorar la estabilidad del suero. En ciertas realizaciones, el péptido apelina modificado se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 38 (apelina-13+5G), SEQ ID NO: 42 (apelina-13+R), SEQ ID NO: 43 (apelina-13+S) y SEQ ID NO: 44 (apelina-13+H).
15

En una realización, el péptido apelina se selecciona del grupo que consiste en apelina-36 (SEQ ID NO: 8), apelina-17 (SEQ ID NO: 7), apelina-13 (SEQ ID NO: 6) y [Pyr¹]Apelina-13. En otro aspecto, el péptido apelina comprende apelina 13 (SEQ ID NO: 6) o un fragmento de la misma.
20

Los péptidos apelina se eliminan rápidamente de la circulación y tienen una semivida plasmática corta de no más de ocho minutos (Japp, y col., 2008, *J of Amer College Cardiol*, 52 (11): 908-13). Las proteínas de fusión apelina de la invención tienen una mayor semivida en comparación con los péptidos apelina.

En la divulgación se incluyen análogos de apelina modificados para que incluyan aminoácidos no estándar o aminoácidos modificados. Dichos péptidos que contienen aminoácidos no naturales, o naturales pero no codificados, pueden sintetizarse mediante un código genético modificado artificialmente en el que se asignan uno o varios codones para que codifiquen un aminoácido que no es uno de los aminoácidos estándar. Por ejemplo, el código genético codifica 20 aminoácidos estándar; sin embargo, existen tres aminoácidos proteinogénicos adicionales en la naturaleza en circunstancias particulares: selenocisteína, pirrolisina y N-formilmetionina (Ambrogelly, y col. 2007, *Nature Chemical Biology*, 3:29-35; Bock, A. y col., 1991, *TIBS*, 16 (12):463-467 y Théobald-Dietrich, A., y col., 2005, *Biochimie*, 87 (9-10): 813-817). También se incluyen los aminoácidos modificados postraduccionalmente, tales como el ácido carboxiglutámico (γ -carboxiglutamato), la hidroxiprolina y la hipusina. Otros aminoácidos no estándar incluyen, pero no se limitan a, citrulina, 4-benzoilfenilalanina, ácido aminobenzoico, ácido aminohexanoico, N^ε-metilarginina, ácido α -amino-n-butírico, norvalina, norleucina, aloisoleucina, t-leucina, ácido α -amino-n-heptanoico, ácido piperídico, ácido α,β -diaminopropiónico, ácido α,γ -diaminobutírico, ornitina, alotreonina, homoolanina, homoarginina, homoasparagina, ácido homoaaspártico, homocisteína, ácido homoglutámico, homoglutamina, homoisoleucina, homoleucina, homometionina, homofenilalanina, homoserina, homotirosina, homovalina, ácido isonipecótico, β -alanina, ácido β -amino-n-butírico, ácido β -aminoisobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, isovalina, sarcosina, naftilalanina, ácido nipecótico, N-etilglicina, N-propilglicina, N-isopropilglicina, N-metil-alanina, N-etil-alanina, N-metil- β -alanina, N-etil- β -alanina, ácido octahidroindol-2-carboxílico, penicilamina, ácido piroglutámico, sarcosina, t-butilglicina, ácido tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, isoserina y ácido α -hidroxil- γ -aminobutírico. Se conoce en la técnica una variedad de formatos para expandir el código genético y puede emplearse en la práctica de la invención. (Véase, por ejemplo, Wolfson, W., 2006, *Chem Biol*, 13(10): 1011-12.)
25
30
35
40
45

Los análogos de apelina que incorporan tales aminoácidos no estándar o modificaciones postraduccionales pueden sintetizarse mediante procedimientos conocidos. Los análogos de apelina a modo de ejemplo incluyen el análogo de N^ε-metilarginina-apelina-A12, [Nle⁷⁵,Tyr] apelina-36, [Glp⁶⁵Nle⁷⁵,Tyr⁷⁷]apelina-13, (Pyr¹) [Met(O)11]-apelina-13, (Pyr¹) apelin-13, [d-Ala¹²]-A12, y acetato de amida de N-alfa-acetil-nona-D-arginina.
50

También se incluye en la divulgación análogos del componente de apelina de una proteína de fusión de apelina que se modificó para que sea resistente a la escisión, por ejemplo, escisión por la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Se ha demostrado que dichos análogos de apelina aumentan en comparación con los ligandos de apelina no modificados en modelos *in vivo* de respuesta miocárdica a la isquemia (Wang, y col., 1 de julio de 2013, *J Am Heart Assoc.*, 2: e000249).
55

Tales proteínas de fusión de apelina protegidas por escisión incluyen péptidos apelina que se modifican para incluir variantes de sustitución, es decir, variantes elaboradas mediante el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios de escisión dentro de la proteína. Se prevé que tales sustituciones de aminoácidos aumenten la estabilidad de la proteína. Otras proteínas de fusión de apelina protegidas por escisión incluyen péptidos de apelina modificados para incluir grupos amida o acetilo terminales. En algunos aspectos, las proteínas de fusión de apelina protegidas por escisión incluyen aminoácidos proteinogénicos, aminoácidos no estándar o aminoácidos modificados postraduccionalmente. Otras proteínas de fusión de apelina protegidas por escisión o resistentes a la escisión comprenden péptidos apelina modificados que incluyen uno o más aminoácidos de extremo N adicionales. Es deseable que estos péptidos apelina modificados no alteren la capacidad del péptido para activar el APLNR. APLNR incluye SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID
60
65

NO: 44.

Se sabe que la apelina, tal como se mencionó anteriormente, es un ligando de APLNR, un receptor acoplado a proteína G. El término "ligando", tal como se usa en el presente documento, significa una molécula que se une a otra molécula, tal como un receptor. Una molécula de ligando capaz de unirse a un receptor acoplado a la proteína G (GPCR) se selecciona del grupo que consiste en un ión, una molécula orgánica pequeña, un péptido, un polipéptido, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, una proteína y una molécula orgánica grande. Un ligando puede caracterizarse adicionalmente como, por ejemplo, un agonista, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, antagonista competitivo, modulador alostérico positivo o modulador alostérico negativo dependiendo del estado de actividad que confiere a través del receptor al que se une. Por ejemplo, para que los agonistas se unan a un GPCR, se interrumpen otras interacciones moleculares que mantienen a dicho GPCR en un estado inactivo.

El término "agonista", como se usa en el presente documento, incluye un resto que interactúa con (se une directa o indirectamente) y activa un receptor, tal como el receptor APLNR, e inicia una respuesta fisiológica o farmacológica característica de ese receptor, tal como cuando se une a su ligando endógeno. Por ejemplo, al unirse a un GPCR, los restos pueden activar una respuesta intracelular, mejorar la unión de GTP a las membranas celulares o internalizar el receptor. Dicho resto agonista puede ser, por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula grande o una molécula pequeña.

El término "antagonista", como se usa en el presente documento, pretende significar un resto que se une de forma competitiva al receptor en el mismo sitio que un agonista (por ejemplo, el ligando endógeno), pero no activa la respuesta intracelular iniciada por la forma activa del receptor, e inhibiendo así la respuesta intracelular por un agonista o agonista parcial. En algunos casos, los antagonistas no disminuyen la respuesta intracelular basal en ausencia de un agonista o agonista parcial. Un antagonista no tiene que funcionar necesariamente como un inhibidor de la unión competitiva, pero puede actuar mediante el secuestro de un agonista, o la modulación indirecta de un efecto posterior.

Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), que son receptores de siete dominios transmembrana, generalmente transducen sus señales celulares a través de proteínas de unión a nucleótidos de guanina heterotriméricas (proteínas G), que consisten en una subunidad alfa (α), beta (β) y gamma (γ), mientras que la subunidad α contiene un sitio de unión para GTP/GDP, y el dímero $\beta\gamma$ está unido a la subunidad en un estado inactivo. Las proteínas G se producen naturalmente en el lado citoplásmico de la membrana plasmática. La unión de un ligando extracelular conduce a un cambio conformacional en la proteína del receptor que le permite hacer contacto con una proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G) y así aumentar el intercambio de GTP por GDP. Después del intercambio, el dímero $\beta\gamma$ se disocia de la subunidad α . Tanto la subunidad α activada como el dímero $\beta\gamma$ pueden influir en las proteínas efectoras intracelulares.

En general, los GPCR activan una familia particular de subunidades de proteínas $G\alpha$, lo que conduce a la activación o inactivación de una vía de transducción de señales particular. El receptor de apelina (APLNR) es un GPCR.

Tras la interacción con un ligando o molécula de unión, el receptor de apelina (APLNR) desencadena una o más de varias cascadas de señalización intracelular, que incluyen la señalización iniciada por: 1) subunidad de proteína G inhibitoria, $G\alpha_{i/o}$, 2) activación de ERK a través de PKC, o 3) internalización de GPCR. En otras palabras, la respuesta farmacológica y/o fisiológica de APLNR en su estado activo se determina mediante la acción posterior de las subunidades $G\alpha_i$ (que, por ejemplo, inhiben la adenilil ciclasa), ERK fosforiladas o APLNR internalizado. Se entiende que otros efectores intracelulares pueden ser activados por un APLNR activado.

El receptor de apelina (APLNR) originalmente denominado receptor de APJ (O'Dowd, y col., 1993, *Gene* 136(1-2): 355-360), se aisló del ADN genómico humano como un receptor huérfano de 7 dominios transmembrana de 380 aminoácidos. (Véase NCBI RefSeq No. NP_005152, que se incorpora al presente documento como referencia). Se demostró que la apelina es el ligando endógeno para APLNR (APJ) cuando los extractos de tejido del estómago bovino revelaron péptidos apelina que estimulaban la tasa de acidificación en las células CHO que expresan APLNR (APJ) en un intervalo de 0,1-100 nM (Tatemoto, y col., 1998, *Biochem Biophys Res Comm* 251:471-476).

La interacción entre apelina y APLNR y, por lo tanto, la interacción entre las proteínas de fusión de apelina y APLNR, se puede medir mediante una serie de bioensayos *in vitro* (por ejemplo, como en un tubo de ensayo o placa), *ex vivo* (por ejemplo, como en un cultivo celular de un animal vivo) e *in vivo* (por ejemplo, como en un animal vivo) conocidos por los expertos en la materia relevante.

En algunos aspectos, los agonistas de APLNR se seleccionan del grupo que consiste en apelina-36, apelina-19, apelina-17, apelina-13, apelina-12, análogo de N^{α} -metilarginina-apelina-A12, [Nle⁷⁵, Tyr]apelina-36, [Glp⁶⁵Nle⁷⁵, Tyr⁷⁷]apelina-13, (Pyr¹)[Met(O)¹¹]apelina-13 y (Pyr¹)apelina-13.

El polipéptido de fusión de apelina puede ser un agonista de APLNR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41 y fragmentos o derivados de los mismos.

Se sabe que los antagonistas del receptor bloquean la acción hipotensora del APLNR. El derivado peptídico de apelina obtenido modificando la apelina-13 en su fenilalanina (F) de extremo C en alanina (A) (apelina-13 (F13A); SEQ ID NO: 29) fue descrito por Lee, y col. 2005 (*Endocrinol* 146 (1): 231-236) como antagonista funcional. También se informó que el antagonista de APLNR, F13A, mejora la función circulatoria y renal en animales con cirrosis, lo que indica que el antagonista puede haber mediado los efectos hiperactivos de un sistema de apelina regulada al alza en enfermedades patógenas como la fibrosis del hígado (Principe, A., y col. 2008, *Hepatology*, 48 (4): 1193-1201). En algunos aspectos, los antagonistas de APLNR se seleccionan del grupo que consiste en apelina-13 (F13A) (SEQ ID NO: 29), [d-Ala¹²] -A12, ciclo (1-6)CRPRLC-KH-ciclo (9-14)CRPRLC y acetato de amida de N-alfa-acetil-nona-D-arginina (ALX40-4C; n.º de registro CAS 153127-49-2).

En otro aspecto, la proteína o polipéptido de fusión de apelina comprende una molécula de unión a APLNR. En otros aspectos, la proteína o polipéptido de fusión de apelina comprende un agonista de APLNR. En algunos aspectos, el polipéptido de fusión comprende un antagonista de APLNR.

Ensayos de receptores

Se entiende que se emplean ensayos de selección de receptores no solo para las proteínas de fusión de apelina de la invención, sino también para cualquier compuesto de prueba que incluya agonistas y antagonistas de APLNR. Muchos ensayos de selección de receptores para determinar la activación o inactivación del APLNR son muy conocidos en la técnica.

El intercambio de nucleótidos de guanina mediado por GPCR se monitoriza midiendo la unión de [³⁵S] GTPγS a membranas plasmáticas preparadas a partir de células que expresan GPCR de interés. El ensayo [³⁵S] GTPγS generalmente es útil para los receptores acoplados a Gi/o porque Gi/o es la proteína G más abundante en la mayoría de las células y tiene una tasa de cambio de GDP-GTP más rápida que otras proteínas G (Milligan G., 2003, *Trends Pharmacol Sci*, 2003,24:87-90). Los kits de ensayo de proximidad por centelleo (SPA™) disponibles comercialmente permiten la medición de la subunidad α unida a [³⁵S] GTPγS deseada (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.)

La activación de los receptores acoplados a Gi/o da como resultado una actividad disminuida de la adenilil ciclasa y, por lo tanto, la inhibición de cAMP en la célula, a través de las subunidades alfa G, Gi o Go. Para maximizar la señal de inhibición, la forskolina (un activador directo de adenilato ciclasa) se utiliza generalmente para estimular la adenilil ciclasa en el ensayo, y por lo tanto el cAMP, lo que hace que la señal de inhibición sea más fácilmente detectable. Ensayos de cAMP radiométricos SPA™ de GE Healthcare (Piscataway, NJ, EE. UU.) y Flash-Plate™ de Perkin Elmer están disponibles, así como también ensayos homogéneos basados en fluorescencia o luminiscencia (por ejemplo, AlphaScreen™ de PerkinElmer, HitHunter™ de DiscoverX (Fremont, CA, EE. UU.) y FLIPR® de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EE. UU.) para medir la acumulación de cAMP intracelular.

La acción de los GPCR que modulan los niveles de cAMP, como APLNR, puede estar vinculada a la transcripción de la luciferasa en una célula mediante un elemento de respuesta al cAMP (CRE). Un constructo CRE-luc (luciferasa sensible a CRE) codifica un gen indicador de luciferasa bajo el control de un promotor y repeticiones en tándem del elemento de respuesta transcripcional (TRE) de CRE. Tras la activación del receptor, la acumulación de AMPc en la célula se mide por la cantidad de luciferasa expresada en la célula después de la adición de reactivos de detección quimioluminiscentes. Para APLNR, y otros receptores acoplados a Gi, se agrega forskolina para inducir cAMP y una disminución en la actividad de CRE (quimioluminiscencia) indica activación de GPCR. Se encuentran disponibles diversos kits comerciales, tales como Promega (Madison, WI, EE. UU.), SABiosciences (A Qiagen Company, Valencia, CA, EE. UU.), etc.

En algunos casos, la unión del agonista al receptor puede iniciar la señalización mediada por la arrestina, sin desencadenar la señalización mediada por la proteína G o ralentizar la señalización mediada por la proteína G. La interacción de la beta-arrestina (β-arrestina) con los GPCR en la superficie celular puede desacoplar las proteínas G heterotriméricas al receptor y conducir a otras cascadas de señalización celular. Se sabe que la β-arrestina desencadena la endocitosis y la activación de la vía ERK. En un ensayo de ejemplo, la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia o BRET se ha utilizado para estudiar la interacción de los GPCR fusionados a Renilla luciferasa (Rlu) con β-arrestina fusionada a proteína fluorescente verde (GFP). En este ejemplo, BRET se basa en la transferencia de energía entre GPCR-Rlu expresado recombinante y β-arrestina-GFP cuando están muy cerca después de la adición del sustrato de luciferasa coelentrazina, lo que permite la medición de la evaluación en tiempo real de estas proteínas. Interacciones de proteínas en células enteras.

Se han desarrollado otros ensayos, como los análisis PathHunter® GPCR (DiscoverX Corp., Fremont, CA, EE. UU.) que miden directamente la actividad de GPCR detectando la interacción de la β-arrestina con el GPCR activado. Brevemente, el GPCR se fusiona en marco con el pequeño fragmento de enzima ProLink™ y se coexpresa en células que expresan establemente una proteína de fusión de β-arrestina y un mutante de delección de β-galactosidasa (es decir, β-gal, un aceptor de enzimas o EA). La activación del GPCR estimula la unión de la β-arrestina al GPCR etiquetado con ProLink y la complementación de los dos fragmentos de enzima da como resultado la formación de una enzima β-gal activa. Un aumento en la actividad de la enzima (es decir, la activación

de GPCR) se puede medir utilizando reactivos de detección quimioluminiscentes.

Se ha demostrado que las moléculas de β -arrestina regulan la internalización de GPCR (es decir, la endocitosis) luego de la activación de los GPCR, como el APLNR. La activación agonista de los GPCR conduce a cambios conformacionales, la fosforilación del receptor y la activación de la β -arrestina, u otras vías, para mediar el secuestro de receptores de la superficie celular. El mecanismo de secuestro puede ser un medio de desensibilización (es decir, el receptor se degrada después de la internalización) o resensibilización (es decir, el receptor se recicla de nuevo a la superficie celular). Véase, por ejemplo, Claing, A., y col. 2002, *Progress in Neurobiology* 66: 61-79, para revisión.

Los antagonistas de APLNR pueden bloquear la internalización del receptor. Los agonistas de APLNR pueden inducir la internalización y/o la resensibilización de la APLNR (Lee, DK, y col. 2010, *BBRC*, 395:185-189). En algunas realizaciones, el agonista de APLNR exhibe o induce un aumento de la resensibilización de APLNR, según se mide mediante un ensayo de internalización. En otras realizaciones, el agonista de APLNR exhibe o induce una copia incrementada del receptor de la superficie celular del APLNR, según se mide en un ensayo de internalización. La medición del grado (tal como un aumento) de la internalización del receptor en cualquier ensayo de internalización se realiza determinando la diferencia entre la medición no internalizada (es decir, las células sin exposición previa al agonista) y la medición obtenida con el agonista en el ensayo.

El secuestro del receptor de apelina y, por lo tanto, la copia del receptor de apelina, puede medirse mediante una serie de procedimientos bien conocidos en la técnica. La estimulación de agonistas de APLNR puede resultar en un aumento o disminución de la copia del receptor en la superficie de una célula particular. Por ejemplo, un agonista del receptor de apelina que induce la internalización de APLNR puede tener un efecto sobre la presión arterial. Los ensayos de internalización del receptor se realizan de forma rutinaria empleando, por ejemplo, ligandos marcados por fluorescencia o radiomarcados, o marcadores inmunofluorescentes (anticuerpos anti-receptor marcados por fluorescencia), seguidos de microscopía y técnicas de formación de imagen digital (véase, por ejemplo, El Messari y col. 2004, *J Neurochem*, 90:1290-1301 y Evans, N., 2004, *Methods of Measuring Internalization of G Protein-Coupled Receptors*. Current Protocols in Pharmacology. 24: 12.6.1-12.6.22).

La ERK fosforilada (p-ERK) se puede medir en lisados celulares de células que expresan los receptores APLNR para determinar la activación de APLNR. La quinasa 1 y 2 regulada por señales extracelulares endógenas (ERK1 y ERK2), pertenecen a una familia conservada de serina/treonina proteína quinasas y participan en los eventos de señalización celular relacionados con un intervalo de estímulos. La actividad quinasa de las proteínas de ERK está regulada por la fosforilación dual en treonina 202/tirosina 204 en ERK1, y treonina 185/tirosina 187 en ERK2. MEK1 y MEK2 son las principales quinasas en sentido ascendente responsables de ERK 1/2 en esta vía. Se han identificado muchos objetivos aguas abajo de ERK 1/2, incluyendo otras quinasas y factores de transcripción. En un ejemplo, el ensayo p-ERK 1/2 utiliza un procedimiento de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir la fosforilación específica de ERK 1 en lisados celulares de cultivos celulares que expresan receptores recombinantes o endógenos. En otro ejemplo, el ensayo p-ERK 1/2 utiliza un anticuerpo primario (no conjugado) que reconoce a Thr202/Tyr204 fosforilado en ERK1 o phos-Thr185/Tyr187 en ERK2 y un anticuerpo conjugado secundario que reconoce el anticuerpo primario, mientras que el mAb conjugado secundario proporciona un procedimiento de detección a medida que un conjugado reacciona con un sustrato agregado de forma exógena. Varios kits comerciales se encuentran disponibles, tal como AlphaScreen® SureFire™ (PerkinElmer), ThermoScientific (Waltham, MA, EE. UU.), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), ELISAOne (TGR BioSciences (Australia Meridional, Australia), etc.).

Según se usa en el presente documento, el término "unión", tal como en el contexto de la unión del ligando a un receptor (por ejemplo, GPCR) o tal como la unión de un anticuerpo a un antígeno, generalmente se refiere a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades, o estructuras moleculares, tal como una interacción de receptor-ligando, o una interacción de anticuerpo-antígeno. Por lo tanto, una "molécula de unión al receptor" se refiere a un ligando u otro resto, tal como una proteína, que se une, es decir, interactúa con un receptor.

Por ejemplo, la afinidad de unión entre el ligando (por ejemplo, una proteína de fusión de apelina) y el receptor (por ejemplo, un APLNR o un fragmento de unión a ligando de APLNR) corresponde generalmente a un valor K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como alrededor de 10^{-9} M o menos. La afinidad de unión se puede determinar mediante uno o más de varios procedimientos, tal como mediante la resonancia de plasmones superficiales (SPR) utilizando un instrumento BIAcore 3000. Por consiguiente, el ligando se une al receptor con una afinidad correspondiente a un valor de K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad para unirse a un ligando no específico (por ejemplo, BSA, caseína).

El término " K_D " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de ligando-receptor particular. Existe una relación inversa entre K_D y la afinidad de unión, por lo tanto, cuanto menor sea el valor de K_D , mayor será la afinidad. Por lo tanto, el término "afinidad más baja" se relaciona con una menor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, con un valor de K_D mayor.

El término " k_d " (s^{-1} o $1/s$), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción de ligando-receptor particular. Dicho valor también se conoce como el valor k_{off} .

El término " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$ o $1/M$), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción de ligando-receptor particular.

El término " K_A " (M^{-1} o $1/M$), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción de ligando-receptor particular o la constante de equilibrio de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo k_a entre k_d .

El término " CE_{50} " o " CE_{50} ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración efectiva máxima media, que incluye la concentración de un ligando que induce una respuesta, por ejemplo, una respuesta celular, a medio camino entre el punto de referencia y el máximo después de una exposición especificado. La EC_{50} representa esencialmente la concentración de un ligando donde se observa el 50 % de su efecto máximo. Por lo tanto, con respecto a la señalización celular, se observa mayor la actividad con un menor valor de EC_{50} , es decir, el valor de concentración efectiva máxima media (se necesita menos ligando para provocar una mayor respuesta).

En un aspecto, la unión disminuida se refiere a una mayor concentración de proteína EC_{50} , que permite la unión máxima media al receptor o a las células que expresan el receptor objetivo.

En algunos aspectos, la actividad disminuida se refiere a un aumento de la concentración de proteína EC_{50} , que permite la activación celular máxima media al receptor o a las células que expresan el receptor objetivo.

El término " IC_{50} " o " IC_{50} ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración inhibitoria máxima media de una respuesta celular. En otras palabras, la medición de la eficacia de un resto particular (por ejemplo, una proteína, un compuesto o una molécula) para inhibir la función biológica o bioquímica, en donde un ensayo cuantifica la cantidad de dicho resto necesaria para inhibir un proceso biológico dado. Por lo tanto, con respecto a la señalización celular, se observa una mayor actividad inhibitoria con un valor menor de IC_{50} o de una concentración inhibitoria máxima media.

En un aspecto, la proteína de fusión de apelina es un agonista del APLNR con una EC_{50} de menos de aproximadamente 100 nM, o menos de aproximadamente 50 nM, o menos de aproximadamente 25 nM, o menos de aproximadamente 10 nM, o menos de aproximadamente 1 nM, en un ensayo *in vitro* que mide la activación del APLNR. En un aspecto, la proteína de fusión de apelina comprende un dominio Fc unido al extremo N de un péptido apelina y muestra una EC_{50} de menos de aproximadamente 1 nM, o menos de aproximadamente 500 pM.

Proteínas de fusión de apelina

Los procedimientos para preparar proteínas de fusión son conocidos en la técnica. En uno de estos procedimientos, se diseña un vector de expresión de ADN para que contenga una secuencia de ácido nucleico que codifica apelina unida en el marco a una secuencia de ácido nucleico que codifica Fc de tal manera que el vector de expresión de ADN exprese un polipéptido de fusión contiguo. El péptido apelina puede estar unido al extremo C o al extremo N del polipéptido que contiene Fc. Se espera que las proteínas de fusión de apelina de la invención sean más estables que los péptidos apelina solos. Las proteínas estables en suero incluyen proteínas que confieren resistencia a la degradación o tienen un aclaramiento reducido de la circulación. Las proteínas de fusión de apelina estables en suero a modo de ejemplo incluyen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41.

En el contexto de la construcción de proteínas de fusión, la frase "unido en el marco" significa que los componentes están unidos entre sí de tal manera que sea posible su traducción, uso u operación completa y, por lo tanto, no se interrumpa. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende al menos dos polipéptidos puede tener o no una secuencia enlazadora o espaciadora entre los polipéptidos y, por lo tanto, los polipéptidos se unen en el marco como un polipéptido continuo, manteniendo cada polipéptido su funcionalidad. Dos o más polipéptidos unidos o fusionados juntos en una proteína de fusión se derivan generalmente de dos o más fuentes independientes y, por lo tanto, una proteína de fusión comprende dos o más polipéptidos unidos que normalmente no se encuentran unidos en la naturaleza. Además, el ADN que codifica tales proteínas de fusión puede contener secuencias de enlace que mantienen la traducción operable en el marco (por ejemplo, el codón triplete) de las moléculas de ARNm transcrito que codifican dichos polipéptidos.

La frase "unido de forma operativa", tal como en el contexto de construcciones de vectores de expresión de ADN, una secuencia de control, por ejemplo, un promotor u operador, se coloca de manera adecuada en una posición relativa a una secuencia de codificación de tal manera que la secuencia de control dirija la producción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante.

El término "péptido de señal" o "secuencia peptídica de señal" se define en el presente documento como una secuencia peptídica generalmente presente en el extremo N de los polipéptidos secretores o de membrana recién sintetizados que dirige el polipéptido a través de o en una membrana celular de la célula (la membrana plasmática

en procariotas y la membrana de retículo endoplásmico en eucariotas). Por lo general, se elimina posteriormente por escisión enzimática. En algunos aspectos, dicho péptido de señal puede ser capaz de dirigir el polipéptido hacia la vía secretora de una célula. En algunos aspectos, el péptido de señal comprende la secuencia de aminoácidos de 1-29 de ratón ROR1, n.º de acceso de GenBank BAA75480 (SEQ ID NO: 10). En otros aspectos, el péptido de señal tiene al menos aproximadamente el 96 %, o al menos aproximadamente el 97 %, o al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos del péptido de señal mostrado en SEQ ID NO: 9. En otros aspectos, el péptido de señal está codificado por un nucleótido que tiene al menos aproximadamente el 96 %, o al menos aproximadamente el 97 %, o al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de homología con la secuencia del ácido nucleico del péptido de señal que se muestra en SEQ ID NO: 9.

En la invención, los componentes o péptidos de la proteína de fusión de Fc están separados por un péptido enlazador (o "espaciador"). Tales enlazadores peptídicos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, poliglicina) y generalmente permiten el plegamiento adecuado de uno o ambos componentes de la proteína de fusión. El enlazador proporciona una región de unión flexible del componente de la proteína de fusión, permitiendo que los dos extremos de la molécula se muevan independientemente, y puede desempeñar un papel importante en la retención de cada una de las funciones apropiadas de los dos grupos. Por lo tanto, la región de unión actúa en algunos casos como un enlazador, que combina las dos partes, y como un espaciador, que permite que cada una de las dos partes forme su propia estructura biológica y no interfiera con la otra parte. Además, la región de unión debe crear un epítipo que no será reconocido por el sistema inmune del sujeto como extraño, en otras palabras, no se considerará inmunogénico. La selección del enlazador también puede tener un efecto sobre la actividad de unión de la molécula de fusión. (Véase Huston, y col., 1988, *PNAS*, 85:16:5879-83; Robinson & Bates, 1998, *PNAS* 95(11):5929-34; Arai, y col. 2001, *PEDS*, 14(8):529 -32, y Chen, X. y col., 2013, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1357-1369.) En un aspecto de la divulgación, el péptido apelina está conectado al extremo C o al extremo N del polipéptido que contiene Fc, o fragmento del mismo, a través de uno o más enlazadores peptídicos.

La longitud de la cadena enlazadora puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15 o más residuos de aminoácidos, pero generalmente está entre 5 y 25 residuos. Los ejemplos de enlazadores incluyen enlazadores de poliglicina, tales como Gly-Gly, Gly-Gly-Gly (3Gly), 4Gly, 5Gly, 6Gly, 7Gly, 8Gly or 9Gly. Los ejemplos de enlazadores también incluyen enlazadores peptídicos Gly-Ser tales como Ser-Gly, Gly-Ser, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n y (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n, en donde n = 1 a 10. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n y (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n también se conocen como (G4S)_n y (S4G)_n, respectivamente.

En la invención, el péptido apelina está conectado al extremo C del polipéptido que contiene Fc a través de uno o más enlazadores peptídicos Gly-Ser.

En una realización, el enlazador peptídico es (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃, o (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄. En una realización, el enlazador peptídico comprende (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO: 11).

En algunos aspectos, el péptido de señal está conectado al extremo N del polipéptido de fusión Fc a través de uno o más enlazadores o espaciadores peptídicos. En algunos aspectos, el péptido de señal se codifica aguas arriba de la proteína de fusión Fc en un vector de expresión y un espaciador se codifica en el marco entre el péptido de señal y el extremo N de la proteína de fusión Fc. En otro aspecto, el enlazador o espaciador peptídico comprende RSTGSPGSG (SEQ ID NO: 12).

Polipéptidos de fusión de apelina modificados

En otros aspectos, la secuencia de cualquier proteína de fusión Fc de la invención puede modificarse de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para la glicosilación unida a N. En aún otros aspectos, la secuencia de cualquier proteína de fusión Fc de la invención puede modificarse para potenciar o disminuir la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. En otros aspectos, la secuencia de cualquier proteína de fusión Fc de la invención puede modificarse para resistir la escisión o degradación. Como tal, la adición de uno o más aminoácidos de extremo C al péptido apelina de una proteína de fusión de Fc de apelina puede conferir una mayor estabilidad, tal como resistencia a la degradación. Sin estar limitado por una teoría, los aminoácidos de extremo C adicionales pueden eliminar la susceptibilidad a los sitios de escisión dentro del péptido o la proteína de fusión. La estabilidad puede ser conferida debido a un aclaramiento disminuido o lento de la circulación (es decir, excreción o aclaramiento renal). Tales modificaciones a los péptidos apelina no alteran su capacidad para activar el APLNR. Los péptidos apelina modificados a modo de ejemplo se incluyen en las Tablas 3 y 4, por ejemplo, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44. Las proteínas de fusión de apelina de la invención a modo de ejemplo incluyen SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41.

En general, las proteínas, incluidas las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento, pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de tales aminoácidos modificados (incluidos los

aminoácidos no estándar, indicados anteriormente) y/o asociaciones con sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto generalmente se determina por la capacidad de retener al menos sustancialmente la selectividad y/o especificidad asociadas de la proteína de fusión Fc, por ejemplo, la unión a APLNR. El aminoácido modificado puede seleccionarse, por ejemplo, entre un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido geranil-geranilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico, o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico, o similares. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa, por ejemplo, para aumentar aún más la semivida en suero del polipéptido, reducir la antigenicidad del polipéptido o aumentar la estabilidad de almacenamiento del polipéptido. Los aminoácidos se modifican, por ejemplo, de forma cotraduccional o postraduccional durante la producción recombinante (por ejemplo, la glicosilación ligada a N en los motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamíferos) o se modifican por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranil-geranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido acilado graso, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. Las referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos son abundantes en la bibliografía. Ejemplos de protocolos se encuentran en Walker, 1998, Protein Protocols en CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJ

Las proteínas, incluidas las proteínas de fusión Fc de la invención, también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar aún más su semivida circulante. Polímeros a modo de ejemplo y procedimientos para unirlos a péptidos se ilustran en, por ejemplo, los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546. Polímeros ilustrativos adicionales incluyen polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000 g/mol). Véase, por ejemplo, el documento WO2012/125408, que describe un PEG-apelina-36, un polipéptido con efectos inotrópicos prolongados en ratas.

En un aspecto, se proporcionan proteínas que incluyen proteínas de fusión Fc que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo radiomarcado se puede usar para fines tanto diagnósticos como terapéuticos. En otro aspecto, las proteínas, incluidas las proteínas de fusión Fc de la presente invención, pueden conjugarse con una molécula que es un agente terapéutico o un marcador detectable. En un aspecto, el agente terapéutico es un agente citotóxico, tal como un radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc e ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re y ^{225}Ac . Los procedimientos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Junghans y col., en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y los documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse por un procedimiento de cloramina T. En otros aspectos, un marcador detectable puede ser una radioetiqueta, una enzima, un cromóforo o una etiqueta fluorescente.

40 Sistemas de expresión

La invención proporciona un vector de expresión que codifica un polipéptido, por ejemplo, una proteína de fusión de apelina Fc de la invención. Tales vectores de expresión se pueden usar para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores de ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos y vectores de ácidos nucleicos virales (ARN o ADN). En una realización, una proteína de fusión Fc o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido está comprendida en un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (tal como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, Nat Biotech 12, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (tal como se describe en, por ejemplo, los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), o un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119. Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

El vector comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, que incluye un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico descritas, en donde la molécula de ácido nucleico está unida de forma operativa a una secuencia de control de expresión.

En una realización, el vector es adecuado para la expresión de un polipéptido de la invención en una célula bacteriana. Los ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264, 5503-5509), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares.

Un vector de expresión también puede ser, o de manera alternativa, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles, tales como el factor alfa de levadura, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel y col., Ed., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley InterScience Nueva York y Grant y col., 1987, *Methods in Enzymol* 153, 516-544).

En otras realizaciones, el vector de expresión es adecuado para la expresión en células de insectos infectadas con baculovirus. (Kost, T; y Condreay, JP, 1999, *Current Opinion in Biotechnology* 10(5):428-33.)

Se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, en el que la molécula de ácido nucleico está unida de forma operativa a una secuencia de control de expresión adecuada para la expresión en una célula huésped de mamífero.

Las secuencias de control de expresión están diseñadas para controlar y dirigir la transcripción de genes de interés y la expresión posterior de proteínas en varios sistemas celulares. Los plásmidos combinan un gen de interés expresable con secuencias de control de la expresión (es decir, casetes de expresión) que comprenden elementos deseables tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, marcadores seleccionables, operadores, etc. En un vector de expresión de la invención, la proteína de fusión Fc o las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos pueden comprender o estar asociadas con cualquier promotor, potenciador, marcador seleccionable, operador, proteína represora, secuencias de terminación poliA y otros elementos facilitadores de la expresión.

"Promotor", tal como se usa en el presente documento, indica una secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN a la cual está unida de forma operativa, es decir, que está unida de tal manera que permite la transcripción de la proteína de fusión Fc o la secuencia de nucleótidos que codifican anticuerpos cuando las señales apropiadas están presentes. La expresión de una proteína de fusión Fc o secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo se puede colocar bajo el control de cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica. Los ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador IE de CMV humano o promotor IE principal de CMV (CMV-MIE), así como RSV, promotor tardío de SV40, promotores de SL3-3, MMTV, ubiquitina (Ubi), ubiquitina C (UbC) y LTR de VIH).

En algunas realizaciones, el vector comprende un promotor seleccionado del grupo que consiste en SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC y LTR de VIH.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden unirse de forma operativa a una secuencia de terminación poli (A) eficaz, un origen de replicación para el producto plásmido en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible regulable (inducible, reprimible, regulado por el desarrollo) a diferencia de un promotor constitutivo como el IE de CMV (el experto en la materia reconocerá que dichos términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en ciertas condiciones).

Los marcadores seleccionables son elementos muy conocidos en la técnica. Bajo las condiciones selectivas, solo las células que expresan el marcador seleccionable apropiado pueden sobrevivir. Comúnmente, los genes marcadores seleccionables expresan proteínas, generalmente enzimas, que confieren resistencia a varios antibióticos en cultivos celulares. En otras condiciones selectivas, las células que expresan un marcador de proteína fluorescente se hacen visibles y, por lo tanto, son seleccionables. Las realizaciones incluyen beta-lactamasa (bla) (gen de resistencia a antibióticos beta-lactámicos o de resistencia a ampicilina o ampR), bls (gen de la acetil transferasa de la resistencia a blasticidina), bsd (gen de la resistencia a la blasticidina-S-desaminasa), bsr (gen de resistencia a la blasticidina-S), Sh ble (gen de resistencia a Zeocin®), higromicina fosfotransferasa (hpt) (gen de resistencia a higromicina), tetM (gen de resistencia a tetraciclina o tetR), neomicina fosfotransferasa II (npt) (gen de resistencia a neomicina o neoR), kanR (gen de resistencia a kanamicina) y pac (gen de resistencia a puomicina).

En ciertas realizaciones, el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables seleccionados del grupo que consiste en bla, bls, BSD, bsr, Sh ble, hpt, tetR, tetM, npt, kanR y pac. En otras realizaciones, el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables que codifican proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), proteína fluorescente ciano (CFP), proteína fluorescente ciano mejorada (eCFP) o proteína fluorescente amarilla (YFP).

Para los fines de la presente invención, la expresión génica en células eucariotas puede estar fuertemente regulada usando un promotor fuerte que está controlado por un operador que, a su vez, está regulado por una proteína reguladora, que puede ser una "proteína de fusión reguladora" (RFP) recombinante. La RFP consiste esencialmente en un dominio de bloqueo de la transcripción y un dominio de unión a ligando que regula su actividad. Ejemplos de tales sistemas de expresión se describen en el documento US20090162901A1.

Tal como se usa en el presente documento, "operador" indica una secuencia de ADN que se introduce en o cerca de un gen de tal manera que el gen pueda ser regulado por la unión de la RFP al operador y, como resultado, evite o

permita la transcripción del gen de interés, es decir, un nucleótido que codifica un polipéptido de la invención. Se han caracterizado varios operadores en células procariotas y bacteriófagos (Neidhardt, ed., *Escherichia coli and Salmonella*; Cellular and Molecular Biology 2d, Vol 2 ASM Press, Washington D.C. 1996). Estos incluyen, pero no se limitan a, la región operadora del gen LexA de *E. coli*, que se une al péptido LexA, y los operadores de lactosa y triptófano, que se unen a las proteínas represoras codificadas por los genes LacI y trpR de *E. coli*. Estos también incluyen los operadores de bacteriófagos de lambda P_R y los genes P22 *ant/mn* de fagos, que se unen a las proteínas represoras codificadas por lambda cI y P22 arc. En algunas realizaciones, cuando el dominio de bloqueo de la transcripción de la RFP es una enzima de restricción, como NotI, el operador es la secuencia de reconocimiento de dicha enzima. Un experto en la materia reconocerá que el operador debe estar ubicado adyacente al promotor, o 3', de modo que sea capaz de controlar la transcripción por parte del promotor. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.972.650 especifica que las secuencias tetO deben estar a una distancia específica de la caja TATA. En realizaciones específicas, el operador se coloca preferiblemente aguas abajo del promotor. En otras realizaciones, el operador se coloca dentro de 10 pares de bases del promotor.

En ciertas realizaciones, el operador se selecciona del grupo que consiste en el operador tet (tetO), la secuencia de reconocimiento NotI (no del conocimiento de la presente invención; según el conocimiento de la presente invención NotI es una enzima de restricción), el operador LexA, el operador de lactosa, el operador de triptófano y el operador de Arc (AO). En algunas realizaciones, la proteína represora se selecciona del grupo que consiste en TetR, LexA, LacI, TrpR, Arc, LambdaC1 y GAL4. En otras realizaciones, el dominio de bloqueo de la transcripción se deriva de una proteína represora eucariota, por ejemplo, un dominio represor derivado de GAL4. Los operadores bacterianos pueden emplearse en mamíferos y otros sistemas de células huésped (véase, por ejemplo, el documento US 20090162901A1).

En un sistema de expresión celular a modo de ejemplo, las células se diseñan para expresar la proteína represora de tetraciclina (TetR) y una proteína de interés se coloca bajo el control transcripcional de un promotor cuya actividad está regulada por TetR. Dos operadores TetR en tándem (tetO) se colocan inmediatamente aguas abajo de un promotor/potenciador CMV-MIE en el vector. La transcripción del gen que codifica la proteína de interés dirigida por el promotor CMV-MIE en dicho vector puede ser bloqueada por TetR en ausencia de tetraciclina o algún otro inductor adecuado (por ejemplo, doxiciclina). En presencia de un inductor, la proteína TetR es incapaz de unirse a tetO, por lo tanto, se produce la transcripción y luego la traducción (expresión) de la proteína de interés. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.435.553).

Otro ejemplo de sistema de expresión celular incluye proteínas de fusión reguladoras, tales como la proteína de fusión TetR-ER_{LBD}T2, en la que el dominio de bloqueo de la transcripción de la proteína de fusión es TetR y el dominio de unión al ligando es el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER_{LBD}) con mutaciones T2 (ER_{LBD}T2; Feil y col., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:752-757). Cuando las secuencias de tetO se colocan corriente abajo y cerca del promotor CMV-MIE potente, la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés del promotor CMV-MIE/tetO se bloqueó en presencia de tamoxifeno y se desbloqueó mediante la eliminación de tamoxifeno. En otro ejemplo, el uso de la proteína de fusión Arc2-ER_{LBD}T2, una proteína de fusión que consiste en un dímero de cadena única que consiste en dos proteínas Arc conectadas por un enlazador de 15 aminoácidos y el ER_{LBD}T2 (*supra*), implica un operador de Arco (AO), más específicamente dos operadores de Arc en tándem inmediatamente corriente abajo del promotor/potenciador CMV-MIE. Las líneas celulares pueden ser reguladas por Arc2-ER_{LBD}T2, en donde las células que expresan la proteína de interés son impulsadas por un promotor CMV-MIE/ArcO2 y son inducibles mediante la eliminación de tamoxifeno. (Véase, por ejemplo, el documento US 20090162901A1).

En algunas realizaciones, un vector de la invención comprende un promotor híbrido de CMV-MIE/TetO o CMV-MIE/AO2.

Los vectores de la invención también pueden emplear herramientas de recombinación Cre-lox para facilitar la integración de un gen de interés en un genoma huésped. Una estrategia de Cre-lox requiere al menos dos componentes: 1) Cre recombinasa, una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios loxP; y 2) sitios loxP (por ejemplo, una secuencia de 34 pares de base pb específica que consiste en una secuencia núcleo de 8 pb, donde tiene lugar la recombinación, y dos repeticiones invertidas flanqueantes de 13 pb) o sitios lox mutantes. (Véase, por ejemplo, Araki y col., 1995, *PNAS* 92: 160-4; Nagy, A. y col., 2000, *Genesis* 26:99-109; Araki y col., 2002, *Nuc Acids Res* 30(19):e103 y el documento US20100291626A1). En otra estrategia de recombinación, la FLP recombinasa derivada de levadura se puede utilizar con la secuencia de consenso FRT (véase también, por ejemplo, Dymecki, S.M., 1996, *PNAS* 93 (12): 6191-6196).

En otro aspecto, un gen (es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante de la invención) se inserta dentro de una secuencia que potencia la expresión del casete de expresión y está opcionalmente unido de forma operativa a un promotor, en donde el gen unido al promotor está flanqueado 5' por un primer sitio de reconocimiento de recombinasa y 3' por un segundo sitio de reconocimiento de recombinasa. Dichos sitios de reconocimiento de recombinasa permiten la recombinación mediada por Cre en la célula huésped del sistema de expresión. En algunos casos, un segundo gen unido a un promotor está aguas arriba (3') del primer gen y está flanqueado 3' por el segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa. En otros casos, un segundo gen

unido a un promotor está flanqueado 5' por el segundo sitio de recombinasa, y flanqueado 3' por un tercer sitio de reconocimiento de recombinasa. En algunas realizaciones, los sitios de reconocimiento de recombinasa se seleccionan de un sitio loxP, un sitio lox511, un sitio lox2272 y un sitio FRT. En otras realizaciones, los sitios de reconocimiento de recombinasa son diferentes. En una realización adicional, la célula huésped comprende un gen capaz de expresar una recombinasa Cre.

En algunas realizaciones, el vector comprende además un gen de la proteína de unión X-box 1 (mXBP1) capaz de aumentar la producción de proteínas/la secreción de proteínas mediante el control de la expresión de los genes implicados en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER). (Véase, por ejemplo, Ron D, y Walter P., 2007, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 519-529).

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las procariotas y eucariotas (de una sola célula o de múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células de mamíferos, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En ciertas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata o ratón. En otras realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), células retinianas, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, Células L, células C127, SP2/0, NS-0, células MMT, células tumorales y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6®).

En algunas realizaciones, la célula es una célula CHO. En otras realizaciones, la célula es una célula CHO K1.

Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la expresión de un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado (es decir, episomal), tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un polipéptido recombinante de la invención. En otras realizaciones, la presente invención proporciona una línea celular producida transfectando de manera estable una célula huésped con un plásmido que comprende un vector de expresión de la invención.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un procedimiento para producir una proteína de fusión Fc de la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de a) cultivar una célula huésped de la invención como se describe en el presente documento anteriormente y b) purificar la proteína fusión Fc (*supra*) de los medios de cultivo.

Usos terapéuticos y diagnósticos

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una composición que comprende un polipéptido o proteína de fusión de apelina tal como se define en el presente documento.

Las composiciones pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como adyuvantes y excipientes conocidos de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995, y utilizando la experimentación de ensayo y error.

Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocidos, deben ser adecuados para la fusión de apelina elegida o la proteína de fusión Fc de apelina de la presente invención y el modo de administración elegido. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la estabilidad apropiada de la sustancia farmacológica, la respuesta terapéutica deseada para un paciente, la composición y el modo de administración particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos.

La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía y modo adecuados. Las vías adecuadas de administración de una proteína de fusión de apelina de la presente invención *in vivo* son muy conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la materia. (Daugherty, AL, y Msrny, RJ, 2006, *Adv Drug Delivery Rev*, 58 (5-6): 686-706).

Las proteínas de fusión de apelina son agentes administrados para el tratamiento de afecciones cardiovasculares, tales como agentes inotrópicos, específicamente agentes inotrópicos positivos. Sin limitarse a una teoría particular,

- los agentes inotrópicos positivos aumentan la contractilidad miocárdica y se usan para sostener la función cardíaca en afecciones como la insuficiencia cardíaca congestiva, el infarto de miocardio, la miocardiopatía y otras. (Véase Dai, y col., 2006, *Eur J Pharmacol* 553 (1-3): 222-228; Maquire, y col., *Hypertension*. 2009; 54: 598-604; y Berry, M., y col., 2004 *Circulation*, 110:II187-II193.) La vasodilatación inducida por apelina puede brindar protección en la lesión por isquemia-reperfusión. La promoción de la angiogénesis y la inducción de grandes vasos no permeables mediante péptidos apelina pueden contribuir a la recuperación funcional de la isquemia. (Eyries M, y col., 2008, *Circ Res* 103: 432-440; Kidoya H, y col., 2010, *Blood* 115: 3166-3174).
- Los agonistas del receptor de apelina se consideran agentes proangiogénicos que se administran para aumentar la respuesta cardíaca, mejorar la función cardíaca, estabilizar la función cardíaca, limitar la disminución de la función cardíaca o promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en una zona isquémica o dañada del corazón u otro tejido. Por lo tanto, los agonistas del receptor de apelina de la invención son útiles para promover la angiogénesis y, por lo tanto, tratar la isquemia, reestablecer el flujo sanguíneo a los órganos y tejidos isquémicos, por ejemplo, para tratar la isquemia de las extremidades, la isquemia periférica, la isquemia renal, la isquemia ocular, la isquemia cerebral o cualquier enfermedad isquémica.
- Las proteínas de fusión de apelina de la invención son agentes administrados para aumentar el flujo sanguíneo o aumentar la contractilidad cardíaca, como para tratar o aliviar la isquemia y la insuficiencia cardíaca.
- Las proteínas de fusión de apelina son agentes que se administran para tratar o aliviar la lesión por isquemia y perfusión, tal como para limitar la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) o retrasar la aparición de necrosis del tejido cardíaco o proporcionar un tratamiento preventivo, por ejemplo, para proteger el corazón de la lesión por isquemia/reperfusión (I/R), mejorar la función cardíaca o limitar el desarrollo del infarto de miocardio.
- Las proteínas de fusión de apelina son agentes que se administran para tratar afecciones metabólicas relacionadas con la diabetes y la obesidad. La apelina mejora la tolerancia a la glucosa y potencia la utilización de la glucosa, por parte del tejido muscular, en ratones obesos resistentes a la insulina (Dray y col., 2008, *Cell Metab* 8: 437-445). Los ratones con inactivación de la apelina presentan una menor sensibilidad a la insulina (Yue y col., 2010, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E59-E67). Por lo tanto, las proteínas de fusión de apelina son agentes administrados para mejorar la tolerancia a la glucosa en el tratamiento de la diabetes resistente a la insulina.
- Los cambios en los niveles de ARNm de la apelina muscular también se correlacionan con las mejoras de la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo (Besse-Patin, A. y col., 27 de agosto de 2013, *Int J Obes (Lond)*. doi: 10.1038/ijo.2013.158, publicación electrónica previa a la impresión). Debido a tales mejoras metabólicas en el tejido muscular y a la vasodilatación inducida por apelina, las proteínas de fusión de apelina agonistas también se pueden administrar para estimular el crecimiento y la resistencia muscular.
- Se ha demostrado que los aislamientos primarios de VIH-1 también pueden usar APLNR como correceptor y que los péptidos apelina sintéticos inhibieron la entrada de VIH-1 en células que expresan CD4-APLNR (Cayabyab, M., y col., 2000, *J. Virol.* 74: 11972-11976). Las proteínas de fusión de apelina se administran para tratar la infección por VIH.
- La neuroprotección de la apelina también se observa cuando los péptidos apelina actúan a través de vías de señalización para promover la supervivencia neuronal (Cheng, B, y col., 2012, *Peptides*, 37(1):171-3). Las proteínas de fusión de apelina se administran para promover o aumentar la supervivencia de las neuronas.
- Un agonista del receptor de apelina también se describe como un supresor de sofocos. (Véase el documento WO2012/133825, publicado el 4 de octubre de 2012.) Las proteínas de fusión de apelina de la invención también pueden administrarse para tratar, mejorar o suprimir los síntomas de sofocos en un sujeto.
- El péptido apelina puede promover la obesidad a través de la expansión del tejido adiposo. La apelina es inducida por la hipoxia y produce la angiogénesis dentro del interior hipóxico del tejido adiposo en expansión. (Kunduzova O, y col., 2008, *FASEB J*, 22:4146-4153). Sin embargo, algunas proteínas de fusión de apelina son antagonistas de la APLNR que actúan como agentes inhibidores de este mecanismo, de manera específica para el tejido, para promover la pérdida de peso o tratar la obesidad. Por lo tanto, las proteínas de fusión de apelina son agentes de bloqueo que se administran para tratar la obesidad y para promover la pérdida de peso.
- La angiogénesis patológica, que participa en la promoción del crecimiento tumoral o la neovascularización en la retina, puede responder a la apelina o al antagonista de APLNR. (Kojima, Y. y Quertermous, T., 2008, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:1687-1688; Rayalam, S. y col. 2011, *Discovery Anticancer Drug Discov* 6(3):367-72). Por lo tanto, las proteínas de fusión de apelina son agentes inhibidores que se administran para retardar el crecimiento del tumor o la metástasis o para tratar el cáncer y la enfermedad metastásica. Las proteínas de fusión de apelina también se administran para tratar la retinopatía.
- Los antagonistas de APLNR también pueden reducir la angiogénesis y mejorar la función, como en los tejidos fibróticos, mejorando los efectos de un sistema de apelina hiperactivo causado por una enfermedad patogénica

(Principe, y col., 2008; Reichenbach, y col., 2012, *JPET* 340(3):629-637). Sin limitarse a ninguna teoría, el bloqueo del sistema de apelina puede retardar la formación de tejido conjuntivo fibroso en exceso en un órgano o tejido en un proceso reparador o reactivo, tal como en una afección patológica como la cirrosis. Por lo tanto, las proteínas de fusión de apelina se pueden usar como agentes inhibidores que se administran para retardar o prevenir la progresión de la fibrosis, o para tratar la fibrosis.

En algunos aspectos de la divulgación, las proteínas de fusión Fc de la invención proporcionan un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o afección, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de apelina suficiente para tratar la enfermedad o afección.

En un aspecto de la divulgación, en el presente documento se proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con la apelina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de apelina.

En algunos aspectos, la proteína de fusión de apelina comprende un polipéptido que comprende un péptido apelina fusionado a un dominio Fc, o un fragmento del mismo.

Las enfermedades o afecciones se seleccionan del grupo que consiste en enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca descompensada aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, cardiomiopatía, isquemia, lesión por isquemia/reperfusión, hipertensión pulmonar, diabetes, obesidad, cáncer, enfermedad metastásica, homeostasis de fluidos, angiogénesis patológica, retinopatía e infección por VIH.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de apelina es un agonista de APLNR útil para tratar una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardíaca descompensada aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, cardiomiopatía, isquemia, lesión por isquemia/reperfusión, hipertensión pulmonar, diabetes, síntomas de sofocos, homeostasis de fluidos e infección por VIH. En otra realización, la proteína de fusión de apelina es un agonista de APLNR que promueve la supervivencia de las células neuronales. En otra realización, la proteína de fusión de apelina es un agonista de APLNR que disminuye la sensibilidad a la insulina.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de apelina es un antagonista de APLNR útil para tratar una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, cáncer, enfermedad metastásica, retinopatía, fibrosis y angiogénesis patológica. En una realización, la proteína de fusión de apelina es un antagonista de APLNR que promueve la pérdida de peso. En una realización, la proteína de fusión de apelina es un antagonista de APLNR que disminuye la angiogénesis patológica o la neovascularización. En otras realizaciones, la proteína de fusión de apelina es un antagonista de APLNR que disminuye o inhibe el crecimiento tumoral.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína de fusión Fc significa una cantidad suficiente para mejorar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones en una intervención terapéutica que comprende la administración de dicha proteína. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y el estado general del sujeto.

En el presente contexto, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren al manejo y cuidado de un paciente con el fin de combatir una afección, como una enfermedad o un trastorno. El término pretende incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que sufre el paciente, como la administración del ingrediente activo (proteína de fusión Fc) para aliviar o mitigar los síntomas y/o complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección y/o para curar o eliminar la enfermedad, el trastorno o la afección, así como para prevenir la afección, en el que la prevención debe entenderse como el manejo y cuidado de un paciente con el fin de detener la progresión de la enfermedad e incluye la administración de los ingredientes activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones. No obstante, los tratamientos preventivos, paliativos y terapéuticos (curativos) son aspectos de la invención. El sujeto que se ha de tratar es un mamífero, en particular un ser humano.

El tratamiento puede ser tratamiento de mantenimiento, prevención de recurrencias o estabilización de la enfermedad o afección.

La presente divulgación incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las proteínas de fusión de apelina descritas en el presente documento en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales y procedimientos de tratamiento que comprenden la administración de dichas combinaciones a sujetos que lo necesiten.

Dichos componentes terapéuticamente activos adicionales incluyen inhibidores de VEGF, medicamentos para la presión arterial, bloqueadores de los canales de calcio, digitálicos, antiarrítmicos, inhibidores de ACE, anticoagulantes, inmunosupresores, analgésicos, vasodilatadores, etc.

Las proteínas de fusión de apelina de la invención proporcionan agentes con propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como la semivida y la estabilidad en suero circulante en comparación con los péptidos apelina que no tienen un dominio Fc o fragmento de un dominio Fc. En una realización, el nivel sérico posterior a la inyección de la proteína de fusión de apelina aumenta o se eleva en más de aproximadamente 1 hora, o más de aproximadamente 2 horas, o más de aproximadamente 3 horas, o más de aproximadamente 4 horas, o más de aproximadamente 5 horas, o más de aproximadamente 10 horas, o más de aproximadamente 24 horas. En otras realizaciones, la proteína de fusión de apelina tiene una semivida en suero o plasma de más de aproximadamente 10 minutos, o más de aproximadamente 1 hora, o más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más de aproximadamente 10 horas, o más de aproximadamente 24 horas.

Las proteínas de fusión de apelina marcadas de la invención pueden usarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades o trastornos. La divulgación proporciona la detección o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno, que comprende: (a) evaluar la existencia del receptor de apelina (APLNR) en células o muestras de tejido de un sujeto usando una o más proteínas de fusión de apelina que se unen inespecíficamente al APLNR objetivo; y (b) comparar el nivel de APLNR con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normal, donde un aumento del nivel analizado de APLNR en comparación con el nivel de control de APLNR es indicativo de la enfermedad o el trastorno, o indicativo de la gravedad de la enfermedad o del trastorno.

Las proteínas de fusión de apelina de la invención se pueden usar para analizar los niveles de APLNR en una muestra biológica usando procedimientos inmunohistoquímicos muy conocidos en la técnica. Otros procedimientos basados en apelina útiles para detectar la proteína APLNR incluyen inmunoensayos como el inmunoensayo unido a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). En tales kits y procedimientos se pueden usar marcadores de proteínas de fusión de apelina, incluyendo los marcadores conocidos en la técnica marcadores de enzimas, tales como la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa; etiquetas de radioisótopos, como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio C^{21}In y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); y etiquetas luminiscentes, tales como luminol y luciferasa; y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

La presencia de proteínas de fusión de apelina marcadas puede detectarse *in vivo* con fines de diagnóstico. En un aspecto, el diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de proteínas de fusión de apelina marcadas; b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la proteína de fusión de apelina marcada se concentre en los sitios en los que se puede detectar APLNR y para permitir que la proteína de fusión de apelina marcada no unida se aclare hasta alcanzar el nivel de referencia; c) determinar un nivel de referencia; y d) detectar la proteína de fusión de apelina marcada en el sujeto, de modo que la detección de la proteína de fusión de apelina marcada por encima del nivel de referencia sea indicativa de que el sujeto presenta un aumento de proteína APLNR, que tiene la enfermedad o trastorno, o que el aumento de la proteína APLNR es indicativo de la gravedad de la enfermedad o trastorno. De acuerdo con dicho aspecto, la proteína de fusión de apelina está marcada con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección utilizando un sistema de formación de imágenes particular conocido por los expertos en la materia. Los niveles de referencia pueden determinarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo la comparación de la cantidad de proteína de fusión de apelina marcada detectada con un valor estándar previamente determinado para un sistema de formación de imágenes en particular. Los procedimientos y sistemas que se pueden usar en los procedimientos de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (TC), exploración corporal total, como tomografía por emisión de positrones (TEP), imágenes por resonancia magnética (IRM) y ecografía.

La invención también proporciona un kit (por ejemplo, un kit farmacéutico) que comprende uno o más recipientes llenos con al menos una proteína de fusión activadora de la invención. Los kits de la invención se pueden usar en cualquier procedimiento aplicable, incluyendo, por ejemplo, el diagnóstico. Opcionalmente asociado con dicho(s) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, que refleje la autorización por parte de tal organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración humana, (b) instrucciones de uso, o (c) tanto la autorización para la fabricación como las instrucciones de uso.

Ensayos *ex vivo* e *in vivo*

Las proteínas de fusión Fc de apelina de la invención mantienen una actividad sustancial con respecto al APLNR al tiempo que prolongan la semivida en suero. La transducción de señales de APLNR proporciona el nexo entre las proteínas de fusión Fc de apelina y los efectos terapéuticos y biológicos conocidos de la apelina. Por lo tanto, cualquier demostración de un efecto de la proteína de fusión Fc de apelina sobre la actividad de APLNR *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* proporciona pruebas razonables de un efecto biológico o médico *in vivo* de la proteína de fusión Fc de apelina en un paciente o animal. Entre otros estudios, se ha demostrado que apelina/APLNR es un sistema de protección endógeno contra la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) miocárdica y los efectos antiapoptóticos de la activación de apelina/APLNR, específicamente PERK, que protege contra dicha lesión (Zeng, y col. 2009, *Peptides*, 30(6):1144-52, publicación electrónica de 24 de febrero de 2009).

Los agonistas de APLNR, incluyendo los péptidos apelina endógenos, los análogos de apelina y los péptidos apelina

modificados, demuestran la actividad terapéutica en varios ensayos *in vivo* (por ejemplo, PEG-apelina-36, como en el documento WO2012125408 y agonistas de apelina no peptídicos como en Iturrioz, X. y col. 2010, *FASEB J*, 24(5):1506-17. Publicación electrónica de 29 de diciembre de 2009).

- 5 Se ha demostrado que el antagonismo de APLNR produce un aumento de la frecuencia cardíaca y la contractilidad cardíaca (Ashley, EA, y col. 2005, *Cardiovasc Res*. 65 (1): 73-82). Además, se ha demostrado que el péptido apelina altera la electrofisiología de los cardiomiocitos. Se utilizaron técnicas de fijación de membranas de células completas para investigar el potencial de acción (AP) y las corrientes iónicas en miocitos aislados de aurícula izquierda (LA) de conejo antes y después de la administración de apelina (véase, por ejemplo, Farkasfalvi, K., y col., 2007, *Biochem Biophys Res Commun*. 357(4):889-95. Publicación electrónica de 12 de abril de 2007; y Cheng, CC, y col., 2013, *Eur J Clin Invest*. 43(1):34-40. Publicación electrónica de 28 de octubre, 2012). La isotropía inducida por el agonismo de apelina también se puede evaluar midiendo los parámetros de ECG en corazones aislados de ratones o ratas utilizando un sistema de Langendorf o de funcionamiento del corazón. Dichas técnicas electrofisiológicas e *in vivo*, como el microultrasonido o la ecocardiografía, se utilizan para evaluar la acción terapéutica de los polipéptidos de la invención.

- Los efectos protectores de los polipéptidos de fusión Fc de apelina pueden evaluarse después de una lesión por isquemia/reperfusión (I/R) miocárdica o hipoxia/reoxigenación (H/R) en corazones de ratas o ratones aislados como en el sistema de Langendorf (ver, por ejemplo, Zeng, y col. 2009, *Peptides*, 30(6):1144-52, publicación electrónica de 24 de febrero de 2009; Pisarenko, y col. 2010, *Kardiologiya*, 50(10):44-9 y Pisarenko, y col., 2013, *J Pharmacol Pharmacother*. "Effects of structural analogues of apelin-12 in acute myocardial infarction in rats", publicación electrónica previa a la impresión).

- También se puede realizar ligadura de LAD transitoria con administración de agonista de apelina antes de la reperfusión. (Véase Pisarenko, y col. 2011, *Bull Exp Biol Med*. 152(1):79-82; Li, L. y col., 2012, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(5):H605-18, publicación electrónica de 29 de junio de 2012 y Tao, J., y col., 2011, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(4):H1471-86, publicación electrónica de 29 de julio de 2011). Después de la lesión cardíaca, se pueden utilizar los parámetros de microultrasonido para medir la función con respecto a la mejora, así como la evaluación del tamaño del infarto.

- Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica el modo de elaboración y el uso de los procedimientos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, concentraciones, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

Ejemplos

Ejemplo 1- Clonación de construcciones de expresión

- Se utilizaron fragmentos de genes sintéticos para generar fusiones de hFc de extremo N y extremo C con apelina-13. Se insertó ADN que codifica las fusiones resultantes, hFc-Apelina13 (SEQ ID NO: 1) y Apelin13-hFc (SEQ ID NO: 3) en vectores de expresión aguas abajo de un promotor de CMV, utilizando técnicas estándar de clonación molecular. Se generaron líneas celulares estables de CHO y se usaron para la producción de proteínas de fusión, que luego se purificaron mediante procedimientos de afinidad. Las proteínas de fusión hFc-Apelina13 de extremo N y Apelin13-hFc de extremo C migran en geles SDS-PAGE compatibles con sus masas previstas. (Véase la Figura 3A). Se utilizó el análisis de transferencia Western, realizado con el anticuerpo anti-apelina (Abcam, #ab59469), para confirmar la presencia de apelina en hFc-Apelina13 y Apelin13-hFc. (Véase la Figura 3B.)

50 Ejemplo 2- Potencia y eficacia de las proteínas de fusión de apelina Fc en un ensayo de indicador de cAMP

- Se evaluó la modulación de los niveles de cAMP intracelular mediante el péptido apelina no modificado (Bachem, # H-4568.0001) y las proteínas de fusión de la apelina 13 de la invención mediante un bioensayo que se desarrolló para detectar la activación de hAPLNR. Se transfectó una línea celular HEK293 para expresar de forma estable la hAPLNR humana de longitud completa (aminoácidos 1-380 de número de acceso NP_005152.1), junto con un indicador de luciferasa [elemento de respuesta cAMP (CRE,4X)-luciferasa]. La línea celular resultante, HEK293/CRE-luc/hAPLNR, se mantuvo en DMEM que contenía FBS al 10 %, NEAA, penicilina/estreptomicina y 100 µg/ml de higromicina B. Para el bioensayo, se sembraron células HEK293/CRE-luc/hAPLNR en placas de ensayo de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en 80 µl de OPTIMEM suplementado con FBS al 0,1 % y penicilina/estreptomicina/l-glutamina y se incubaron durante 16 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. A la mañana siguiente, para medir la inhibición de la producción de cAMP inducida por forskolina a través de la activación de hAPLNR, el péptido apelina no modificado y las proteínas de fusión de apelina 13 se diluyeron en serie (1: 3) y luego se mezclaron con forskolina (Sigma, # F6886) en un tampón de ensayo (5 µM de concentración final de forskolina) y se añadieron a las células. Después de 5 horas de incubación a 37 °C en CO₂ al 5 %, se midió la luminiscencia después de la adición del reactivo One Glo (Promega, # E6051) utilizando un instrumento Victor X (Perkin Elmer). Los datos se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación logística de 4 parámetros con el software Prism 5

(GraphPad).

La proteína de fusión hFc-Apelina13 promovió la inhibición de la liberación de cAMP a partir de células HEK293/CRE-luc/hAPLNR estimuladas con forskolina con un valor de EC_{50} de 174 pM y Apelina13-hFc activada con un valor de EC_{50} de 22,1 nM. En este ensayo, apelina-13 se activó con un valor de EC_{50} de 36,5 pM. (Véase la Figura 4).

Ejemplo 3- Potencia y eficacia de las proteínas de fusión de Fc en un ensayo de β -arrestina

La plataforma PathHunter® de DiscoverX se basa en el reclutamiento de β -arrestina para GPCR en respuesta al tratamiento con un ligando relevante. En este formato de ensayo, la β -arrestina se fusiona con un mutante de delección en el extremo N de la β -galactosidasa (β -gal) y se expresa de forma estable en las células, mientras que el GPCR se fusiona con un fragmento de β -gal de complementación débil más pequeño (42 aminoácidos). La estimulación del ligando de GPCR en este ensayo da como resultado el reclutamiento de β -arrestina en el GPCR, lo que obliga a la complementación de los dos fragmentos de β -gal y da como resultado la formación de una enzima funcional que convierte el sustrato en señal detectable (DiscoverX Corporation, Fremont, CA, EE.UU.).

Para el ensayo, las células DiscoverX CHO-K1/hAPLNR se colocaron en placas a 10.000 células por pocillo en medios de ensayo (DiscoverX Corporation; #93-0250E2) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C en CO₂ AL 5 %. Las células se trataron luego con una dilución en serie de 1:10 de un péptido apelina-13 no modificado o las proteínas de fusión apelina-13. Después de 1,5 horas de incubación a 37 °C, se añadieron reactivos de detección según las especificaciones del fabricante y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una medición de luminiscencia con un instrumento Victor (PerkinElmer).

Las proteínas hFc-Apelina13, apelina-13 y Apelina13-hFc activaron las células DiscoverX CHO-K1/hAPLNR de manera dependiente de la dosis, con valores de EC_{50} de 992 pM, 17,6 pM, y 44,2 nM (valor extrapolado), respectivamente (Figura 5).

Ejemplo 4- Potencia y eficacia de las proteínas de fusión Fc en un ensayo de pERK

Para medir el efecto de las proteínas de fusión apelina-13 de la invención sobre la vía de señalización de APLNR, se usó un ensayo para cuantificar la cantidad de ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) y el ERK total de una línea celular que expresa APLNR. Se transfectó una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) para expresar de manera estable el APLNR humano de longitud completa (hAPLNR; aminoácidos 1-380 de número de acceso NP_005152.1) bajo el control de un promotor de CMV inducible por doxiciclina. La línea celular resultante, CHO/hAPLNR se mantuvo en medio F12 de Ham que contenía FBS al 10 %, penicilina/estreptomomicina, L-glutamina e higromicina B a 250 µg/ml.

Para el ensayo, las células CHO/hAPLNR se sembraron en placas de ensayo de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo en 200 µl de F12 de Ham que contenían FBS al 10 %, L-glutamina, penicilina/estreptomomicina y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 24 horas. Al día siguiente, para inducir la expresión del APLNR y preparar las células para el ensayo de pERK, primero se lavaron las células una vez con 250 µl de 1x PBS (Life Technologies; #20012-043), luego se privaron de suero en F12 de Ham que contenía FBS al 0,1 %, BSA al 1 %, L-glutamina, penicilina/estreptomomicina, 0,5 µg/ml de doxiciclina durante 24 horas. El día del ensayo, las células se trataron con una dilución en serie 1:10 de péptido apelina no modificado o proteínas de fusión en F12 de Ham complementado con BSA al 1 %, penicilina/estreptomomicina, L-glutamina durante 15 minutos a 37 °C en CO₂ al 5 %. Al final de la incubación, las células se lavaron con 200 µl de PBS y posteriormente se lisaron con 100 µl de tampón de lisis ELISAone (TGR BioSciences; # EBF001). Luego se analizaron los extractos para determinar los niveles de ERK fosforilado (pERK1/2) y de ERK total, según las especificaciones del fabricante (TGR Biosciences, # EKT001). Las señales de fluorescencia se midieron utilizando un lector de placas Spectramax (Molecular Devices). Se calculó la relación de pERK1/2 medido con respecto a ERK total medido y los resultados se analizaron utilizando GraphPad Prism.

En el ensayo de pERK, hFc-Apelina13 y Apelina13-hFc aumentaron la proporción de pERK1/2 a ERK1/2 total en células CHO/hAPLNR de una manera dependiente de la dosis, con valores de CE_{50} de 216 pM y 33 nM, respectivamente (Figura 6).

Ejemplo 6- Estudio farmacocinético para evaluar la estabilidad en suero de las fusiones de Fc

A los ratones C57/Bl6 (n=3 por grupo) se les administró por vía subcutánea (sc) hFc (2,5 mg/kg) o Apelina13-hFc (2,8 mg/kg) (Figura 7A) y se recogió el plasma a 1, 4, 24 y 48 horas. En un experimento separado, se inyectó hFc-Apelina13 s.c. en ratones C57/Bl6 (n=3 por grupo) a 5 mg/kg y el suero se recogió en 0, 1, 2, 4, 5, 6, 24 horas y 2, 3, 7, 14, 21 días (Figura 7B).

Para evaluar los niveles de suero/plasma de las proteínas administradas, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos durante 18 horas a 4 °C con 100 µl/pocillo de anticuerpo de IgG antihumano de cabra (Jackson ImmunoLab; 109-005-098) a una concentración de 1 µg/ml en PBS. Las placas se bloquearon posteriormente durante 1 hora a

temperatura ambiente (TA) con 300 µl/pocillo de 1X solución de bloqueo/diluyente de leche (KPL; #100108). Luego se añadieron a la placa diluciones de hFc (para la curva estándar) y muestras de suero en 100 µl de diluyente. Después de incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron y se detectó un Fc humano unido a la placa mediante la adición de un anticuerpo de IgG antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmuLab; #109-035-098) a la placa durante 7 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se desarrollaron durante 7 minutos con una solución de TMB (MP Biomedical; # 152346) para producir una reacción colorimétrica y luego se neutralizaron con 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 2,0N (Mallinckrodt; # H381-05) antes de medir la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un lector de placas Spectramax (Molecular Devices). Los datos se analizaron utilizando el software SoftMax para determinar las concentraciones de las muestras en suero.

Los niveles en suero de Apelina13-hFc alcanzaron un máximo de 10 µg/ml (380 nM) a ~ 4 horas y se mantuvieron comparables a los de hFc después de 48 horas (Figura 7A). Los niveles en suero de hFc-Apelina13 alcanzaron un máximo de 3 µg/ml (100 nM) a las 24 horas y disminuyeron gradualmente a 1 µg/ml (38 nM) en el día 14 (Figura 7B).

Ejemplo 7- Potencia y eficacia de los péptidos apelina en un ensayo CRE

La apelina-13 que tiene un Fc atado a su extremo N (hFc-Apelina13) muestra mejor potencia que la apelina-13 que tiene Fc atado a su extremo C (Apelina-hFc), tal como se observa en los Ejemplos 2 a 6 anteriores. Los péptidos Apelina-13 modificados, tales como los péptidos Apelina-13 que tienen uno o más aminoácidos delimitados o agregados al extremo N o al extremo C, se analizaron para determinar sus potencias relativas con respecto a la activación de APLNR.

La modulación de los niveles de cAMP mediante el péptido apelina-13 no modificado (Bachem, # H-4568.0001) y los péptidos apelina modificados de la invención se evaluaron usando un bioensayo que se desarrolló para detectar la activación de hAPLNR, según el procedimiento del Ejemplo 2 (*supra*). Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 5 (GraphPad).

Tal como se muestra en la Tabla 3, apelina-13 puede tolerar deleciones de aminoácidos tanto en el extremo N como en el extremo C, a la vez que conserva toda la eficacia y muestra diferentes grados de potencia reducida en comparación con la apelina-13. Además, apelina-13 puede tolerar la adición de residuos de aminoácidos a su extremo C, como cinco residuos de glicina y aun así retener la eficacia total, pero con una potencia reducida, en relación con la apelina-13. Se prevé que variaciones similares de las proteínas de fusión de Fc-apelina mantendrán su eficacia.

Table 3: Los péptidos y derivados de apelina mantienen la eficacia en el ensayo CRE

Péptido apelina	Secuencia de aminoácidos	EC ₅₀ (M)
Apelina-13 (SEQ ID NO: 6)	QRPRLSHKGMPMF	1.403e-013
Apelina-F13A (SEQ ID NO: 29)	QRPRLSHKGMPMA	1.027e-010
Apelina65-76 (SEQ ID NO: 30)	QRPRLSHKGMPMP	5.713e-011
Apelina65-75 (SEQ ID NO: 31)	QRPRLSHKGPM	3.604e-012
Apelina-12 (SEQ ID NO: 32)	RPRLSHKGMPMF	8.704e-013
Apelina-11 (SEQ ID NO: 33)	PRLSHKGMPMF	4.379e-010
Apelina66-76 (SEQ ID NO: 34)	RPRLSHKGMPMP	5.194e-012
Apelina67-76 (SEQ ID NO: 35)	PRLSHKGMPMP	1.137e-013
Apelina66-75 (SEQ ID NO: 36)	RPRLSHKGPM	2.174e-012
Apelina67-75 (SEQ ID NO: 37)	PRLSHKGPM	3.738e-007
Apelina-13 + 5G (SEQ ID NO: 38)	QRPRLSHKGMPMPFGGGGG	1.469e-010

Ejemplo 8- Potencia y eficacia de las proteínas de fusión de apelina modificadas en un ensayo CRE

Varias proteínas de fusión apelina-Fc se elaboraron de manera análoga al Ejemplo 1, excepto que tenían péptidos apelina modificados, tales como SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, fusionadas con la hFc. Dichas proteínas de fusión hFc-Apelina13 tienen un aminoácido de extremo C adicional en el extremo C del componente peptídico de apelina. La modulación de los niveles de AMPc por el péptido apelina-13 en comparación con los péptidos Apelina-13 modificados con hFc unido a cada extremo N del péptido (hFc-Apelina13+) se evaluó utilizando el bioensayo de CRE de forma análoga a los procedimientos del Ejemplo 2 y del Ejemplo 7 (*supra*). Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 5 (GraphPad).

Tal como se muestra en la Tabla 4, las proteínas de fusión de apelina modificadas (que tienen un Fc en el extremo N y un aminoácido adicional en el extremo C del componente de péptido apelina) exhiben actividad en el APLNR similar a la de la apelina-13 no modificada. La proteína de fusión hFc-Apelina13 que tiene una arginina adicional en las células HEK293/CRE-luc/hAPLNR activadas en el extremo C con un valor de EC₅₀ de 60 pM. La proteína de

fusión hFc-Apelina13 que tiene una serina adicional en el extremo C y la proteína de fusión hFc-Apelina13 que tiene una histidina adicional en el extremo C, cada APLNR activado con un valor de EC_{50} de 96 pM y 203 pM, respectivamente. En este ensayo, apelina-13 se activó con un valor de EC_{50} de 56 pM.

5 **Tabla 4: Proteínas de fusión de apelina modificadas mantienen la eficacia en el ensayo de CRE**

Proteína sometida a prueba	Fusión SEQ ID NO: (péptido apelina SEQ ID NO:)	EC_{50} (pM)
apelina-13	-- (SEQ ID NO: 6)	56
hFc-Apelina13-R	SEQ ID NO: 39 (SEQ ID NO: 42)	60
hFc-Apelina13-S	SEQ ID NO: 40 (SEQ ID NO: 43)	96
hFc-Apelina13-H	SEQ ID NO: 41 (SEQ ID NO: 44)	203

Ejemplo 9- Evaluación cardiovascular de fusiones Fc de Apelina

10 Los efectos de las proteínas de fusión Fc de apelina de la invención se evalúan mediante electrocardiografía en ratones y ratas anestesiados, en particular los efectos sobre el intervalo RR (índice de frecuencia cardíaca) y el intervalo QT como índice de la actividad del canal iónico.

15 Los efectos de los agonistas de APLNR sobre la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca y la actividad por radiotelemetría en ratones y ratas se evalúan para las proteínas de fusión Fc de apelina de la invención. Este procedimiento consiste en la implantación de un transductor de presión en la arteria carótida para medir la presión sanguínea de la aorta, la frecuencia y la actividad cardíaca, con un control continuo de los datos.

20 La función cardíaca también se evalúa mediante la determinación de los cambios en la contractilidad cardíaca por los agonistas de APLNR *in vivo*. Un procedimiento es el uso de microultrasonido o ecocardiografía (ECG) en ratones o ratas. Tras la aplicación de las proteínas de fusión Fc de apelina en ratones o ratas, las alteraciones en la función cardíaca del ventrículo izquierdo se monitorizan mediante la medición de los volúmenes diastólicos y sistólicos del extremo del ventrículo izquierdo (EDV y ESV). También se registran otros parámetros, como los diámetros del ventrículo y la frecuencia cardíaca, para calcular la respuesta cardíaca (CO), la fracción de eyección (EF), el volumen de pulsaciones (SV), el acortamiento fraccional (FS) de las imágenes grabadas de las revisiones con microultrasonido.

25 La isotropía, ya sea inducida por agonistas de APNLR o bloqueada por antagonistas, también se evalúa midiendo la presión del ventrículo izquierdo y dP/dT (cambio en la presión con el tiempo), la frecuencia cardíaca y la conductancia cardíaca mediante ECG en corazones aislados de ratones o ratas usando Langendorf o sistema de funcionamiento del corazón.

30 Isquemia/reperfusión miocárdica: los efectos de los polipéptidos de fusión Fc de apelina pueden evaluarse después de una lesión por isquemia/reperfusión (I/R) miocárdica o hipoxia/reoxigenación (H/R) en corazones aislados de ratas o ratones como en el sistema de Langendorf (véase, por ejemplo, Zeng, y col. 2009, *Peptides*, 30 (6): 1144-52, publicación electrónica de 24 de febrero de 2009). Se realiza una ligadura de LAD transitoria, con polipéptidos de fusión de apelina Fc administrados antes de la reperfusión. (Véase, por ejemplo, Pisarenko, y col. 2011, *Bull Exp Biol Med.* 152 (1):79-82.) Se aplican mediciones de microultrasonido de la función cardíaca (descritas anteriormente en el presente documento) para determinar la mejora en este contexto. El tamaño del infarto se evalúa mediante técnicas de histología estándar.

40 La relajación de los anillos aórticos precontraídos se evalúa de la siguiente manera: la preparación *ex vivo* de la aorta torácica de ratón o rata se suspende mediante cables de titanio a un transductor de fuerza. Los anillos se precontraen con un vasoconstrictor (como la fenilefrina, norepinefrina o noradrenalina, endotelina o angiotensina II). Un aumento del diámetro y una disminución de la fuerza medida por el transductor de fuerza indica una capacidad para inducir la vasorelajación. (Ver Iturrioz, X. y col. 2010, *FASEB J.*, 24(5):1506-17, publicación electrónica de 29 de diciembre de 2009 y también el sistema Multi Myograph como en Zhong, y col., 2007, *Cardiovasc Res* 74(3):388-395).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE APELINA Y USOS DE LAS MISMAS
- 55 <130> 8050WO
- <150> US 61/786,172
- <151> 2013-03-14

ES 2 708 957 T3

<150> US 61/906,567

<151> 2013-11-20

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 293

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Arg Ser Thr
20 25 30

Gly Ser Pro Gly Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
35 40 45

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
50 55 60

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
65 70 75 80

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
85 90 95

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
100 105 110

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
115 120 125

ES 2 708 957 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
130 135 140

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
145 150 155 160

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
165 170 175

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
180 185 190

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
195 200 205

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
210 215 220

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
225 230 235 240

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
245 250 255

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys
275 280 285

Gly Pro Met Pro Phe
290

<210> 2
<211> 255
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 2

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

ES 2 708 957 T3

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			20					25					30			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
		35					40					45				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	50					55					60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
65					70					75					80	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				85					90					95		
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
			100					105					110			
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
		115					120					125				
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	130					135					140					
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
145					150					155					160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165					170					175		
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180					185					190			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
		195					200					205				
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	210					215					220					
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Gly	Ser	Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Met	Pro	Phe		
				245					250					255		

<210> 3
<211> 284

ES 2 708 957 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sintética

<400> 3

```

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
1          5          10          15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gln Arg Pro
20          25          30

Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35          40          45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
50          55          60

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
65          70          75          80

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
85          90          95

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
100         105         110

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
115         120         125

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
130         135         140

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
145         150         155         160

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
165         170         175

```

10

ES 2 708 957 T3

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
180 185 190

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
195 200 205

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
210 215 220

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
225 230 235 240

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
245 250 255

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
260 265 270

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 4
<211> 255
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 4

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His
20 25 30

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
35 40 45

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
50 55 60

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
65 70 75 80

ES 2 708 957 T3

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
85 90 95

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
100 105 110

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
115 120 125

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
130 135 140

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
145 150 155 160

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
165 170 175

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
180 185 190

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
195 200 205

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
210 215 220

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
225 230 235 240

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250 255

<210> 5
<211> 77
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Asn Leu Arg Leu Cys Val Gln Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ala Val Cys Gly Gly Ser Leu Met Pro Leu Pro Asp Gly Asn
20 25 30

ES 2 708 957 T3

	Gly	Leu	Glu	Asp	Gly	Asn	Val	Arg	His	Leu	Val	Gln	Pro	Arg	Gly	Ser	
			35					40					45				
	Arg	Asn	Gly	Pro	Gly	Pro	Trp	Gln	Gly	Gly	Arg	Arg	Lys	Phe	Arg	Arg	
		50					55					60					
	Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Met	Pro	Phe				
	65					70					75						
5	<210> 6																
	<211> 13																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
	<400> 6																
10					Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Met	Pro	Phe
					1				5					10			
	<210> 7																
	<211> 17																
15	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
	<400> 7																
		Lys	Phe	Arg	Arg	Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Met	Pro
		1				5					10				15		
20		Phe															
	<210> 8																
	<211> 36																
	<212> PRT																
25	<213> Homo sapiens																
	<400> 8																
		Leu	Val	Gln	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Asn	Gly	Pro	Gly	Pro	Trp	Gln	Gly
		1				5					10					15	
		Gly	Arg	Arg	Lys	Phe	Arg	Arg	Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly
					20					25					30		
		Pro	Met	Pro	Phe												
					35												
30	<210> 9																
	<211> 29																
	<212> PRT																
	<213> Mus musculus																
35	<400> 9																

ES 2 708 957 T3

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala
20 25

<210> 10
<211> 937
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gln Glu Thr
20 25 30

Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Thr
35 40 45

Ser Ser Glu Ile Asp Lys Gly Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
50 55 60

Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
65 70 75 80

Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Ser Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
85 90 95

Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Ile Ser Phe Arg Ala Thr Asn Tyr
100 105 110

Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr
115 120 125

Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Lys Val Val Ser Thr Thr Gly
130 135 140

ES 2 708 957 T3

Val	Leu	Phe	Val	Lys	Phe	Gly	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	
145					150					155					160	
Ser	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Cys	Gln	Pro	Tyr	Arg	Gly	Ile	
				165					170					175		
Ala	Cys	Ala	Arg	Phe	Ile	Gly	Asn	Arg	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Ser	Leu	
			180					185					190			
His	Met	Gln	Gly	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Met	
		195					200					205				
Ile	Gly	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Ser	Asp	Lys	Cys	Ser	Gln	Phe	Ala	Ile	
	210					215					220					
Pro	Ser	Leu	Cys	His	Tyr	Ala	Phe	Pro	Tyr	Cys	Asp	Glu	Thr	Ser	Ser	
225					230					235					240	
Val	Pro	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Cys	Arg	Asp	Glu	Cys	Glu	Val	Leu	Glu	
				245					250					255		
Asn	Val	Leu	Cys	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Met	
		260						265					270			
Ile	Leu	Met	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Cys	Glu	Asp	Leu	Pro	Gln	Pro	
		275					280					285				
Glu	Ser	Pro	Glu	Ala	Ala	Asn	Cys	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Pro	Met	Ala	
	290					295					300					
Asp	Pro	Ile	Asn	Lys	Asn	His	Lys	Cys	Tyr	Asn	Ser	Thr	Gly	Val	Asp	
305					310					315					320	
Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Ser	Gly	Arg	Gln	Cys	Gln	Pro	
				325					330					335		
Trp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Thr	His	Ser	Phe	Thr	Ala	Leu	Arg	Phe	
			340					345					350			
Pro	Glu	Leu	Asn	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	Gln	
		355					360					365				
Lys	Glu	Ala	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Ser	Asp	
	370					375					380					

ES 2 708 957 T3

Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
 385 390 395 400
 Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu
 405 410 415
 Ala Ile Ala Phe Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
 420 425 430
 Lys Ser Ser Ser Pro Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys Pro Val Arg Gly
 435 440 445
 Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
 450 455 460
 Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Glu Cys Thr Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
 485 490 495
 Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
 500 505 510
 Asn Pro Gln Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
 515 520 525
 Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
 530 535 540
 Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Met Asn Gln Gly Asp Leu
 545 550 555 560
 His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
 565 570 575
 Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe
 580 585 590
 Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
 595 600 605

ES 2 708 957 T3

His	Phe	Phe	Val	His	Lys	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Ile	Gly	610	615	620
Glu	Gln	Leu	His	Val	Lys	Ile	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Glu	Ile	625	630	635
Tyr	Ser	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Ser	Leu	Pro	Ile	645	650	655
Arg	Trp	Met	Pro	Pro	Glu	Ala	Ile	Met	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ser	Ser	Asp	660	665	670
Ser	Asp	Ile	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Phe	675	680	685
Gly	Leu	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Ser	Asn	Gln	Glu	Val	Ile	Glu	Met	690	695	700
Val	Arg	Lys	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Cys	Ser	Glu	Asp	Cys	Pro	Pro	Arg	705	710	715
Met	Tyr	Ser	Leu	Met	Thr	Glu	Cys	Trp	Asn	Glu	Ile	Pro	Ser	Arg	Arg	725	730	735
Pro	Arg	Phe	Lys	Asp	Ile	His	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Trp	Glu	Gly	Leu	740	745	750
Ser	Ser	His	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Asn	Ala	Thr	Thr	755	760	765
Gln	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Asn	Pro	770	775	780
Arg	Phe	Pro	Asn	Tyr	Met	Phe	Pro	Ser	Gln	Gly	Ile	Thr	Pro	Gln	Gly	785	790	795
Gln	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Gly	Pro	Ala	Ile	Pro	Gln	Asn	Gln	Arg	Phe	805	810	815
Ile	Pro	Ile	Asn	Gly	Tyr	Pro	Ile	Pro	Pro	Gly	Tyr	Ala	Ala	Phe	Pro	820	825	830
Ala	Ala	His	Tyr	Gln	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Arg	Val	Ile	Gln	His	Cys	835	840	845

ES 2 708 957 T3

Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Arg Gly Ser Thr Ser
850 855 860

Thr Gly His Val Ala Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
865 870 875 880

Asn Val Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
885 890 895

Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
900 905 910

Asp Ser Lys Gln Ser Ser Leu Leu Gly Asp Ser His Ile His Gly His
915 920 925

Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Val
930 935

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 12

Arg Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Gly
1 5

<210> 13
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 708 957 T3

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
1				5					10					15		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			20					25					30			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
		35					40					45				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	50					55					60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
65					70					75					80	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				85					90					95		
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
			100					105					110			
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
		115					120					125				
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	130					135					140					
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
145					150					155					160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165					170					175		
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180					185					190			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
		195					200					205				
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	210					215					220					

Pro Gly Lys
225

<210> 14
<211> 16

ES 2 708 957 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

<210> 15
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
1 5 10 15

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
20 25 30

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
50 55 60

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
65 70 75 80

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
85 90 95

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100

15

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 16

ES 2 708 957 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

10 Ala

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
1 5 10

20
<210> 19
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25
<400> 19

ES 2 708 957 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
1 5 10 15

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
20 25 30

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
50 55 60

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
65 70 75 80

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
85 90 95

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
100

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

ES 2 708 957 T3

<210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 21
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly
 10
 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 22
 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 23
 25
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 1 5 10 15
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 20 25 30
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 35 40 45
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 65 70 75 80
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 85 90 95
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100
 30
 <210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 708 957 T3

<400> 24

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

5 <210> 25
<211> 882
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 25

atgcacagac ctagacgtcg tggaaactcgt ccacctccac tggcactgct cgctgctctc 60

15 ctcttggtg cactggtgc tgatgcaaga tctaccggta gcccgggctc cggagacaaa 120

ES 2 708 957 T3

actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc	180
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	240
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	300
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	360
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	420
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	480
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag	540
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	600
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc	660
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	720
ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gtccctctcc	780
ctgtctccgg gtaaagggtg aggcggttca ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg	840
cagaggccca ggctgagcca caagggtccc atgcccttct ga	882

<210> 26

<211> 855

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 26

atgcacagac ctagacgtcg tggaactcgt ccacctccac tggcactgct cgctgctctc	60
ctcctggctg cacgtggtgc tgatgcacag aggccaggc tgagccacaa gggccccatg	120
cccttcggtg gaggcggttc aggcggagggt ggctctggcg gtggcggatc ggacaaaact	180
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctccctggggg gaccgtcagt ctccctcttc	240
ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacct ctgaggtcac atgcgtgggtg	300
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	360
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc	420
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	480
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc	540
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc	600
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	660

ES 2 708 957 T3

	aatgggagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc	720
	ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	780
	tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagtc cctctccctg	840
	tctccgggta aatag	855
5	<210> 27 <211> 768 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética <400> 27	
	gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60
	ttcttcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
	tgctgtgttg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	180
	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag	420
	aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggaactcc	540
	gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	600
	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagtcc	660
	ctctccctgt ctccgggtaa aggtggaggc ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc	720
	ggatcgcaga ggcccaggct gagccacaag ggccccatgc ctttctga	768
15	<210> 28 <211> 768 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética <400> 28	
	cagaggccca ggctgagcca caagggcccc atgcccttcg gtggaggcgg ttcaggcgga	60
25	ggtggctctg gcgggtggcg atcggacaaa actcacacat gccacccgtg cccagcacct	120

ES 2 708 957 T3

```

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg      180
atctccccga cccctgaggt cacatgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccctgag      240
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg      300
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac      360
tggttgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc      420
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacagggtga caccctgccc      480
ccatccccgg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc      540
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      600
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg      660
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg      720
cacaaccact acacgcagaa gtccctctcc ctgtctccgg gtaaatag      768

```

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 29

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Ala
 1 5 10

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 30

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro
 1 5 10

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 31

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met
 1 5 10

<210> 32
 <211> 12

ES 2 708 957 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Sintética

 <400> 32

 Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe
 1 5 10
 10
 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 33
 20
 Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe
 1 5 10

 <210> 34
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 30
 <400> 34

 Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro
 1 5 10
 35
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 35

 Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro
 1 5 10
 45
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 36
 55
 Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met
 1 5 10

 <210> 37

ES 2 708 957 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética
 <400> 37

10

Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met
 1 5

<210> 38
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintética

20

<400> 38
 Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly

25

<210> 39
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Sintética
 <400> 39

ES 2 708 957 T3

Asp 1	Lys	Thr	His	Thr 5	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 10	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 15	Gly
Gly	Pro	Ser	Val 20	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 25	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 30	Leu	Met
Ile	Ser	Arg 35	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 40	Cys	Val	Val	Val	Asp 45	Val	Ser	His
Glu	Asp 50	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 55	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 60	Gly	Val	Glu	Val
His 65	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 70	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 75	Tyr	Asn	Ser	Thr 80	Tyr
Arg	Val	Val	Ser	Val 85	Leu	Thr	Val	Leu	His 90	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 95	Gly
Lys	Glu	Tyr	Lys 100	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 105	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 110	Pro	Ile
Glu	Lys	Thr 115	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 120	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 125	Pro	Gln	Val
Tyr 130	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 135	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys 140	Asn	Gln	Val	Ser
Leu 145	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 150	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 155	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 160
Trp	Glu	Ser	Asn 165	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 170	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 175	Pro
Val	Leu	Asp	Ser 180	Asp	Gly	Ser	Phe 185	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 190	Thr	Val
Asp	Lys	Ser 195	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 200	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 205	Ser	Val	Met
His 210	Glu	Ala	Leu	His	Asn 215	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 220	Leu	Ser	Leu	Ser

ES 2 708 957 T3

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Arg
245 250 255

<210> 40

<211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

ES 2 708 957 T3

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Ser
245 250 255

<210> 41
<211> 256
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 41

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

ES 2 708 957 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe His
245 250 255

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 42

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Arg
1 5 10

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 43

ES 2 708 957 T3

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Ser
1 5 10

<210> 44

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintética

<400> 44

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe His
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende un péptido apelina fusionado con un dominio Fc de IgG humano, en el que el extremo N del péptido apelina se fusiona con el extremo C del dominio Fc a través de uno o más enlazadores Gly-Ser.
- 5 en el que el péptido apelina se selecciona del grupo que consiste en apelina42-77 (apelina-36), apelina61-77 (apelina-17), apelina63-77 (apelina-15), apelina64-77 (apelina-14), apelina65-77 (apelina-13), apelina66-77 (apelina-12), apelina67-77 (apelina-11), apelina68-77 (apelina-10), apelina73-77 (apelina-5), apelina61-76 (apelina-K16P), apelina61-75 (apelina-K15M), apelina61-74 (apelina-K14P), apelina-F13A, apelina65-76, apelina65-75, apelina66-76, apelina67-76, apelina66-75, apelina 67-75, [Pyr¹]Apelina-13, SEQ ID NO: 38 (apelina-13+5G), SEQ ID NO: 42 (apelina-13+R), SEQ ID NO: 43 (apelina-13+S) y SEQ ID NO: 44 (apelina-13+H).
- 10
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el péptido apelina se selecciona del grupo que consiste en apelina42-77 (apelina-36), apelina61-77 (apelina-17), apelina63-77 (apelina-15), apelina64-77 (apelina-14), apelina65-77 (apelina-13), apelina66-77 (apelina-12), apelina67-77 (apelina-11), apelina68-77 (apelina-10), [Pyr¹]Apelina-13, SEQ ID NO: 38 (apelina-13+5G), SEQ ID NO: 42 (apelina-13+R), SEQ ID NO: 43 (apelina-13+S), and SEQ ID NO: 44 (apelina-13+H).
- 15
3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en el que el uno o más enlazadores Gly-Ser comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
- 20
4. El polipéptido de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el dominio Fc se selecciona del grupo que consiste en dominio CH2 de IgG1 y dominio CH3 de IgG1; dominio CH2 de IgG4 y dominio CH3 de IgG4; dominio CH2 de IgG1 y dominio CH3 de IgG4; y dominio CH2 de IgG4 y dominio CH3 de IgG1.
- 25
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio Fc comprende un dominio bisagra de IgG, en el que opcionalmente el dominio bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22.
- 30
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el péptido forma un homodímero.
7. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
8. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.
- 35
9. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.
10. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.
- 40
11. Ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11, en el que opcionalmente:
 - (a) la molécula de ácido nucleico está unida de forma operativa a una secuencia de control de expresión adecuada para la expresión en una célula huésped; y/o
 - 45 (b) el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables.
13. Célula que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11, en la que opcionalmente:
 - (a) la célula comprende un vector de la reivindicación 12; y/o
 - 50 (b) el ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula; y/o
 - (c) la célula comprende un ácido nucleico que codifica un potenciador de la expresión de proteínas; y/o
 - (d) la célula es una célula eucariota.
14. La célula de la reivindicación 13, en la que la célula:
 - 55 (a) se selecciona del grupo que consiste en CHO, COS, célula retiniana, Vero, CV1, 293, MDCK, HaK, BHK, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431, CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, célula MMT, célula tumoral y una célula PER.C6®; y/o
 - (b) es una célula animal; y/o
 - 60 (c) es una célula de mamífero; y/o
 - (d) es una célula CHO; y/o
 - (e) es una célula CHO-K1.
15. Cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con apelina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración del polipéptido a dicho sujeto, en el que la enfermedad o
- 65

afección se selecciona del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardíaca descompensada aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, cardiomiopatía, isquemia, lesión por isquemia/reperfusión, hipertensión pulmonar, diabetes, obesidad, cáncer, enfermedad metastásica, homeostasis de fluidos, síntomas de sofocos, angiogénesis patológica, retinopatía, fibrosis e infección por VIH.

- 5
16. Kit que comprende uno o más recipientes llenos con al menos un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

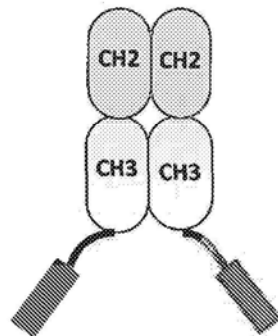
10

FIG. 1A

SEQ ID NO: 2

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
S
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGSGGGGSGGGGSQRPRLSHKGPMPF

FIG. 1B



Dímero de fc-apelina secretado

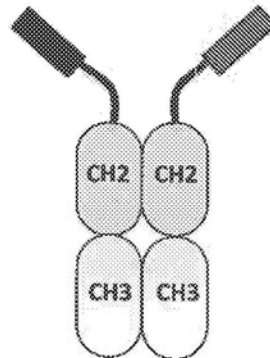
N' -Fc-[enlazador]-apelina-C'

FIG. 2A

SEQ ID NO: 4

QRPRLSHKGPMPPFGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 2B



Dímero de fc-apelina secretado

N' -Fc-[enlazador]-apelina-C'

FIG. 3A



FIG. 3B

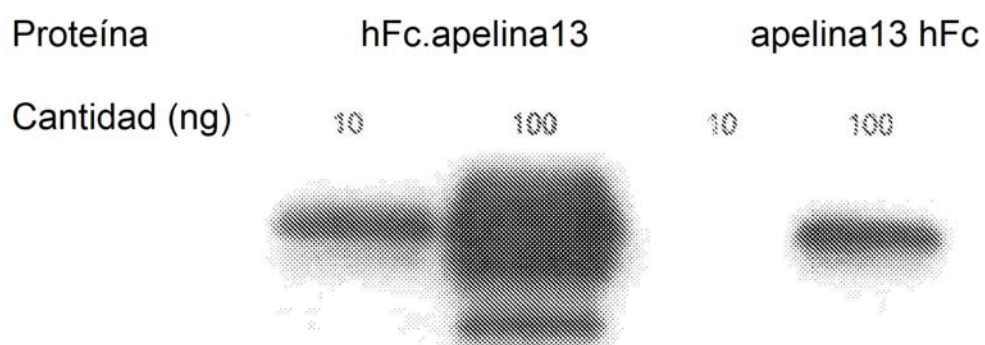
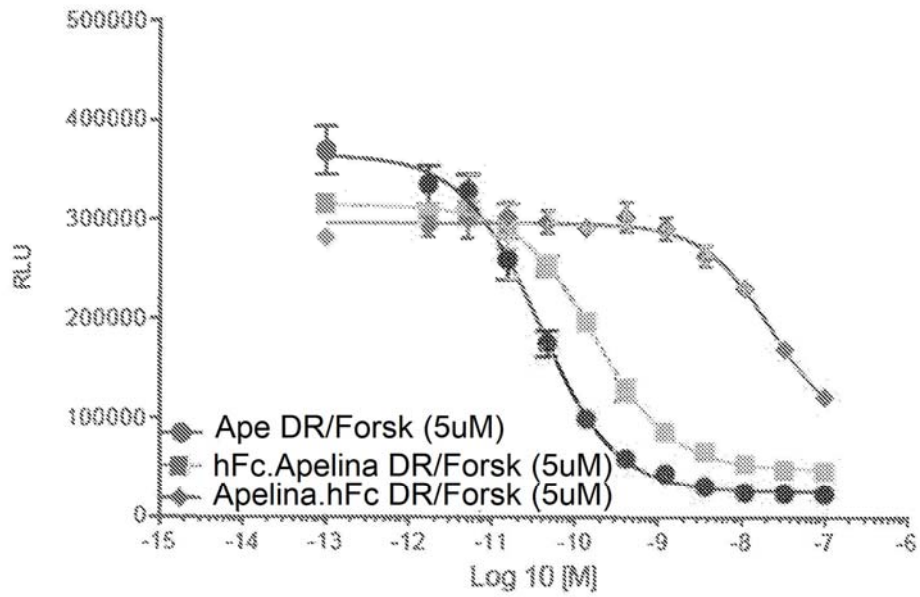


FIG. 4

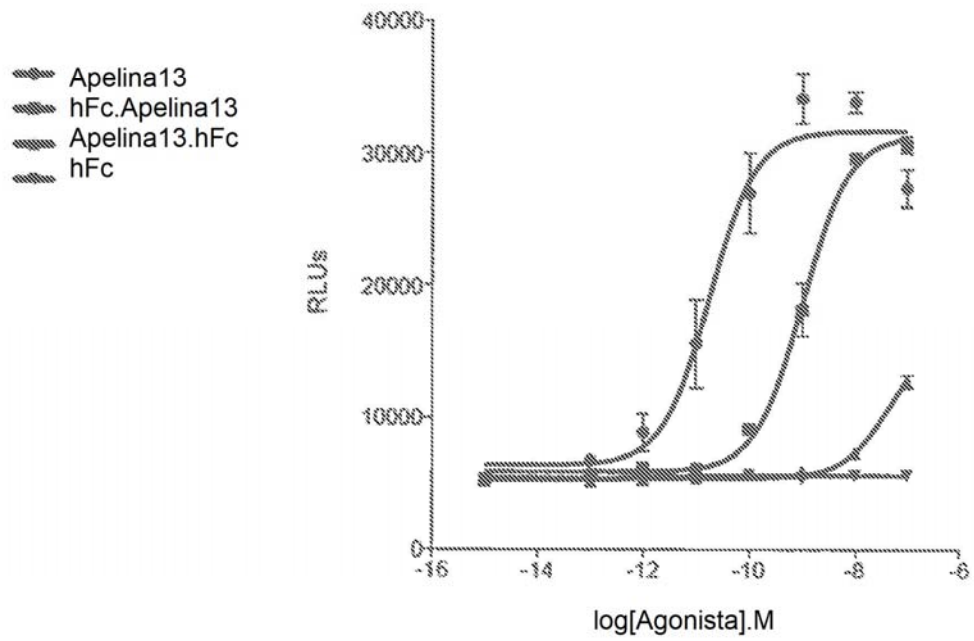
Respuesta a dosis de células 293/Fsc11/hAPJ a apelina (Forskolina 5uM)



Tratamiento	EC ₅₀
Apelina13 DR/Forskolina (5μM)	36,5 pM
hFc.Apelina13 DR/Forskolina (5μM)	174 pM
Apelina13.hFc DR/Forskolina (5μM)	22,1 nM

FIG. 5

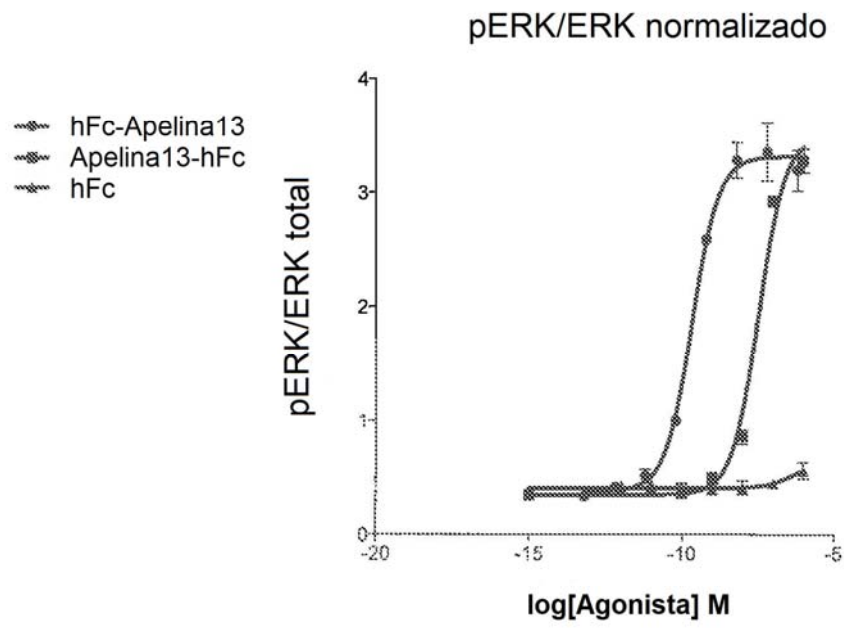
Ensayo de β -arrestina:
células CHO-K1/APLNR Discover X



Tratamiento	EC ₅₀
Apelina13	17,6 pM
hFc.Apelina13	992 pM
Apelina13.hFc	44,2 nM

FIG. 6

Ensayo de pERK: CHO/hAPLNR



Tratamiento	EC ₅₀
hFc.Apelina13	216 pM
Apelina13-hFc	33 nM

FIG. 7A

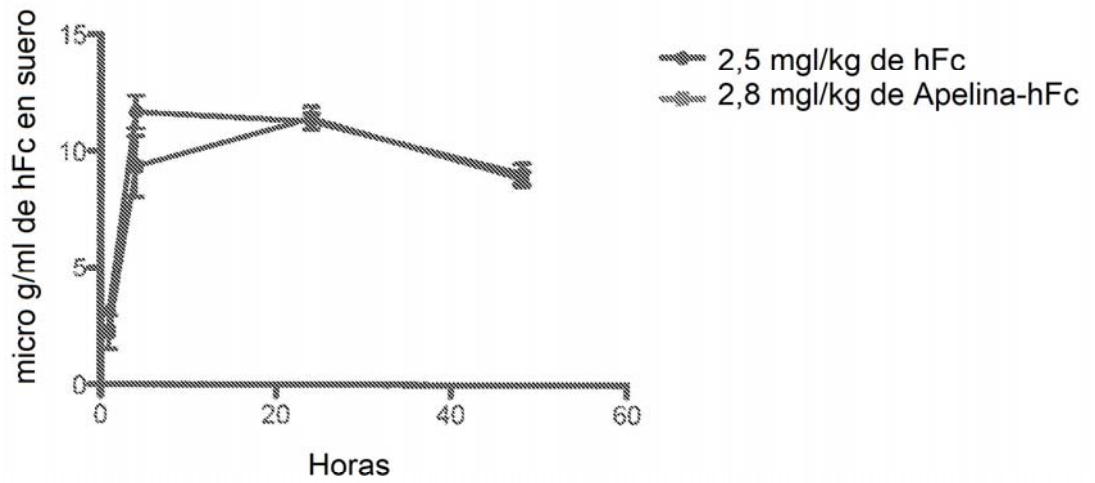


FIG. 7B

