

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 239**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2010 E 16157895 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3050569**

54 Título: **Fragmento de agrina modificado capaz de restituir la fuerza muscular, para su uso como medicamento**

30 Prioridad:

04.09.2009 EP 09011367

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

18.02.2020

73 Titular/es:

**NEUROTUNE AG (100.0%)
Wagistrasse 27a
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**HETTWER, STEFAN;
KUCSERA, STEFAN y
VRIJBLOED, JAN WILLEM**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 743 239 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

Fragmento de agrina modificado capaz de restituir la fuerza muscular, para su uso como medicamento.

5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere a un fragmento de agrina modificado, para su uso como medicamento. Además, la invención se refiere al uso del fragmento de agrina modificado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diferentes enfermedades, especialmente musculares o neuromotrices, pero también para el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con la neurotripsina. Además, la invención se refiere al uso del fragmento de agrina modificado en el tratamiento de diferentes enfermedades. Por último, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el fragmento de agrina modificado y a un fragmento de agrina modificado especial.

Las personas mayores de 60 años se enfrentan a un declive inexorable de la masa corporal magra. Al tratarse de un fenómeno habitual, durante mucho tiempo se consideró que no merecía la pena investigar el mecanismo subyacente. En la actualidad, el declive de la masa corporal magra relacionado con el proceso de envejecimiento recibe los nombres de sarcopenia o fragilidad.

La sarcopenia y la fragilidad son trastornos de gran relevancia en lo que respecta a la funcionalidad y la independencia de los ancianos. Se entiende por sarcopenia el declive degenerativo de la masa y la fuerza muscular relacionados con el envejecimiento, que en su último estadio da paso a la fragilidad y la discapacidad. El ritmo del declive en la masa muscular de los pacientes aquejados de sarcopenia es considerablemente mayor que el de las personas que no sufren la enfermedad. La sarcopenia no es un trastorno estático, sino que se agrava con la edad. Debido a su lento desarrollo, la sarcopenia suele pasar desapercibida para los pacientes hasta que ya han alcanzado una fase avanzada.

La masa muscular sarcopénica se caracteriza porque el número de fibras musculares disminuye de manera continua. El tamaño de las fibras es más heterogéneo y se observa un agrupamiento según el tipo de fibra. Se cree que el agrupamiento según el tipo de fibra está causado por la repetida denervación/reinervación. Además, el músculo envejecido se caracteriza por la infiltración de grasa y tejido conectivo. Todo ello ocasiona un declive en la fuerza muscular y la velocidad de movimientos. Se cree que los cambios relacionados con el envejecimiento que se observan en muchos músculos están causados, en cierta medida, por cambios relacionados con el envejecimiento en la inervación de sus fibras musculares. Durante el proceso de envejecimiento, se observa una reducción considerable y progresiva del número de unidades motrices (UM) funcionales. Asimismo, se observa un aparente declive en la fuerza muscular relacionado con una pérdida significativa de UM en individuos aquejados de enfermedades neuromotrices como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o formas menos severas de la atrofia muscular espinal (AME).

Los ciclos de denervación/reinervación de las fibras musculares necesitan de la plasticidad sináptica. Este proceso de plasticidad sináptica no se entiende aún en profundidad; no obstante, en los últimos años, se identificaron algunos factores clave en la formación y el mantenimiento de las uniones neuromusculares (UNM) (Song y Balice-Gordon, 2008). La proteína bien caracterizada denominada agrina (Bezakova y Ruegg, 2003) desempeña un papel crucial en el proceso de formación de sinapsis por su contribución a la formación y el mantenimiento del aparato postsináptico de las UNM en fase de desarrollo.

La agrina es un proteoglicano de heparán sulfato de gran tamaño con un peso molecular de 400 a 600 kDa. (Número de acceso de la base de datos NP_940978). El núcleo de la proteína consiste en aproximadamente 2000 aminoácidos y su masa es de aproximadamente 225 kDa. Se trata de una proteína multidominio compuesta por 9 dominios K (tipo kunitz), 2 dominios LE (tipo laminina-EGF), un dominio SEA (proteína espermática, enterocinasa y agrina), 4 dominios EG (de tipo factor de crecimiento epidérmico) y 3 dominios LG (laminina globular) (fig. 1). La agrina es una proteína muy importante y los ratones con deficiencia de agrina mueren al nacer por fallos respiratorios. La causa reside en el hecho de que la agrina resulta indispensable para la adecuada inervación de las fibras musculares y estos ratones no son capaces de crear correctamente las UNM.

La agrina aparece en diversas variantes de ajuste y se puede expresar como una proteína secretada, que contiene el dominio N-terminal NtA (agrina N-terminal), que es la forma de agrina más abundante y la forma predominante expresada en las neuronas motrices. Se produce en el soma de las neuronas, es transportada por el axón y expulsada por el terminal axónico del nervio motor hacia la hendidura sináptica de la UNM, donde actúa como agonista de la LRP4 y puede también llegar a formar parte de la lámina basal. En el SNC, la mayor parte de la agrina se expresa como una proteína transmembránica de tipo II mediante el ajuste alternativo en el extremo N-terminal carente del dominio N-terminal NtA (Bezakova y Ruegg, 2003).

Los segmentos ricos en serina/treonina (S/T) de la agrina son los responsables del alto grado de glucosilación, al contener varios sitios de glucosilación y de unión de glucosaminoglucano, lo que da lugar a la gran masa del proteoglicano. La fracción C-terminal de 75 kDa de la agrina que comienza con el primer dominio EG es necesaria para lograr la plenitud de la actividad de agrupamiento de los receptores de acetilcolina (RAC) de las células musculares, aunque el fragmento de 20 kDa más C-terminal resulta suficiente para inducir la agregación de los RAC (Bezakova y

Ruegg, 2003). Varios sitios de unión para compañeros de interacción de la agrina, incluidos el α -dístroglucano, heparina, algunas integrinas y LRP4 están mapeados a la región C-terminal. Las largas cadenas laterales de heparán sulfato constituyen sitios de unión para las proteínas que se unen a la heparina, p. ej., algunos factores de crecimiento.

5 En la parte C-terminal de la agrina humana, existen 2 sitios de ajuste alternativos «y» y «z». En el sitio y, puede haber insertos de 0, 4, 17 o 21 (4+17) aminoácidos y en el sitio z puede haber insertos de 0, 8, 11 o 19 (8+11) aminoácidos. La función de los cuatro aminoácidos insertados en el sitio «y» consiste en crear un sitio de unión de heparina. Las neuronas motrices expresan de manera predominante la agrina y4. El sitio de ajuste más importante de la agrina con respecto a la maduración de las UNM es el sitio z, que aporta a la agrina la capacidad de mostrarse activa como agente
10 de agrupamiento de los receptores de acetilcolina. Es bien sabido que la agrina de longitud completa que contiene la inserción de 8 aminoácidos en el sitio z en presencia del inserto de 4 aminoácidos en el sitio de ajuste «y» (y4z8) genera una variante de agrina una actividad semimáxima de agrupamiento de RAC de 35 pM en ensayos de agrupamiento en miotubos cultivados. La inserción de 11 aminoácidos produce una actividad semimáxima de agrupamiento de RAC de 5 nM, mientras que la inserción de 19 aminoácidos da lugar a una actividad semimáxima de
15 agrupamiento de RAC de 110 pM. La agrina carente de inserciones en este sitio no muestra actividad en los receptores de acetilcolina de los miotubos cultivados in vitro (Bezakova y Ruegg, 2003). Así, la forma más activa de agrina en el ensayo de agrupamiento es la variante y4z8, que es expresada por las neuronas motrices.

20 Se determinó que un fragmento de agrina C-terminal de 40 kDa que contiene los dominios LG2, EG4 y LG3 mostraba actividad en el agrupamiento de RAC con un EC50 de 130 pM en la actividad de agrupamiento de RAC, mientras que los fragmentos más cortos solo mostraban actividades más bajas. El dominio C-terminal LG3 con la inserción en z8 presenta una actividad semimáxima de agrupamiento de RAC de solo 13 nM, que es 100 veces menor que la del fragmento de 40 kDa (Bezakova y Ruegg, 2003).

25 Durante el desarrollo y la maduración de las UNM, la agrina desempeña un papel fundamental en las moléculas que intervienen en el agrupamiento de los receptores de acetilcolina. Mientras que el neurotransmisor acetilcolina desestabiliza las UNM, la agrina, secretada por la neurona motriz, estabiliza e incrementa el agrupamiento de los RAC a través de la fosforilación de la MuSK, una tirosina cinasa receptora ligada a la membrana. Se ha postulado que la interacción de la agrina con la MuSK está mediada por la LRP4, una proteína relacionada con un receptor lipoproteínico
30 de baja densidad (LDRL). Se descubrió que la agrina (y4z8) posee una afinidad con LRP4 10 veces superior a la de la agrina (y4z0), lo que da lugar a la actividad diferencial de agrupamiento de RAC de las distintas variantes de ajuste de la agrina observadas en los ensayos con miotubos cultivados in vitro. Tras la unión con la agrina, LRP4 provoca la autofosforilación de la MuSK, que a continuación activa la cascada de señales para la expresión y el agrupamiento de los receptores de acetilcolina.

35 La neurotripsina se halla en extractos de médula espinal y es producida por las neuronas motrices. La neurotripsina es una proteasa serínica secretada similar a la tripsina que es producida por las neuronas del SNC, así como por las neuronas motrices (Stephan y col. 2008). La neurotripsina está formada una parte N-terminal no catalítica, que contiene un segmento básico (PB) rico en prolina, un dominio kringle (KR), 4 dominios de receptores fagocíticos ricos en cisteína (SRCR), y un dominio de proteasa C-terminal (Gschwend y col, 1997). En los humanos, una delección de 4 bp en el exón
40 7 da lugar a un retraso mental grave no sindrómico. La mutación produce una forma truncada de neurotripsina que carece del dominio de la proteasa, por lo que inactiva la función proteolítica de la enzima.

En la actualidad, la agrina es el único blanco conocido de la neurotripsina. La neurotripsina escinde la agrina en dos
45 sitios distintos, denominados sitio α y sitio β (fig. 1). El sitio α está situado en posición N-terminal con respecto al dominio SEA y el sitio β está situado frente al dominio LG3 de la agrina. La escisión en el sitio α genera un fragmento de agrina C-terminal de aproximadamente 100 kDa que se separa a aproximadamente 130 kDa en un gel de SDS bis-tris del 4 al 12%. La escisión en el sitio β libera el dominio LG3 C-terminal que se separa a aproximadamente 22 kDa en el gel (Molinari y col., 2002; Reif y col, 2007). Todos los fragmentos C-terminales se pudieron detectar en extractos
50 cerebrales y extractos de médula espinal de ratones (Stephan y col, 2008). En ratones *knockout* con la neurotripsina desactivada, no se pudo detectar ningún fragmento. En consecuencia, la neurotripsina parece ser la única proteasa que escinde la agrina en un grado significativo en los dos sitios de escisión. La escisión de la agrina por parte de la neurotripsina contribuye a la plasticidad y la remodelación neuromuscular.

55 Se descubrió que los ratones que sobreexpresan la neurotripsina (NT), denominados ratones sarcopénicos (muslik, M491S) (Stephan y col., 2008), muestran una aparición precoz de la sarcopenia. Los resultados detallados de los análisis sistemáticos de los ratones sarcopénicos demuestran que existe una buena correlación con los datos referidos a humanos. En el documento US 12/007.928, se ofrece una descripción del modelo animal. En breve, los ratones sarcopénicos (muslik M491S) muestran:

60 (i) que las fibras nerviosas de los diafragmas de los ratones crecen hacia las placas terminales individuales,
(ii) las placas terminales fragmentadas en los músculos del diafragma finalmente dan lugar a la desaparición de las placas terminales individuales, es decir, una pérdida de sitios pre y postsinápticos,
(iii) un número reducido de fibras y una disminución de la homogeneidad del tamaño de las fibras en músculos soleos
65 de ratón en animales que sobreexpresan la neurotripsina. Los ratones sarcopénicos poseen un número reducido de

fibras (aproximadamente el 30%) y muestran un aumento en la homogeneidad de los tamaños de las fibras.

En el documento WO 97/21811 se propone el uso de la agrina o fragmentos de agrina en métodos de tratamiento de una enfermedad que afecta a los músculos. Sin embargo, hasta el momento, dichos intentos han resultado infructuosos.

5 El objeto de la presente invención consiste en proporcionar una terapia para diferentes trastornos que conllevan una reducción del número de UNM y/o unidades motrices (UM) funcionales.

Resumen de la invención

10 En general, la invención proporciona novedosas variantes de proteína agrínica humana o de ratón modificadas, según la reivindicación 1, que son resistentes a la actividad proteolítica de la neurotripsina y actúan como reactivo terapéutico biológico para el tratamiento de pacientes humanos aquejados de sarcopenia u otras enfermedades relacionadas con la neurotripsina. La resistencia a la actividad de la neurotripsina se puede lograr, por ejemplo, modificando en
15 consecuencia los sitios de escisión, especialmente el sitio de β -escisión, del fragmento de agrina o mediante la supresión de los sitios de escisión del fragmento.

Las investigaciones del solicitante han mostrado que la actividad in vivo del fragmento de agrina depende principalmente de la presencia de ambos dominios, LG2 y LG3, juntos. El documento WO 97/21811 mostró actividad in vitro del agrupamiento de RAC solo para LG3. Sin embargo, no se pudo mostrar ningún tipo de actividad in vivo de LG3. Al parecer, la activación exclusiva de LRP4 no es suficiente para lograr la plena actividad in vivo.

20 Por tanto, una característica importante de la invención es que los dominios LG2 y LG3 no están separados in vivo debido a la actividad de la neurotripsina. Para evitar dicha separación, el fragmento de agrina usado según la invención ha sido modificado de manera que ya no incluya el sitio de β -escisión de la neurotripsina de origen natural presente entre los dominios LG2 y LG3.

Según la descripción, los términos LG2 y LG3, tal como se usan en la presente solicitud, englobarán todas las posibles variaciones de ajuste de estos dominios mencionados anteriormente. La SEQ ID N°:1, p. ej., muestra la secuencia humana del dominio LG2 con la inserción de 4 aminoácidos (SEQ ID N°: 5) en el sitio «y», mientras que la SEQ ID N°: 2 muestra la secuencia del dominio LG3 con una inserción de 8 aminoácidos (SEQ ID N°: 8) en el sitio z. En el dominio LG2 que se muestra en la SEQ ID N°: 1, el sitio «y» se encuentra entre la prolina 115 y la valina 120. Se entiende que la posición de la valina puede cambiar dependiendo de la longitud de los insertos en el sitio de ajuste «y». En el dominio LG3 que se muestra en la SEQ ID N°: 2, el sitio z se encuentra entre la serina 19 y el ácido glutámico 28. Asimismo,
35 aquí resulta evidente que la posición del ácido glutámico puede cambiar dependiendo de la longitud de los insertos en el sitio de ajuste z. Más adelante se ofrecen otros ejemplos de insertos en los sitios de ajuste mencionados.

Ya que también son posibles variaciones de la secuencia que no afectan a la actividad biológica, la descripción no se limitará a las secuencias indicadas de las diferentes variantes de ajuste de los dominios LG2 y LG3, sino que englobará sus variantes que presenten una coincidencia de al menos el 90%, preferentemente el 95%.

La invención proporciona un fragmento de agrina que, al mismo tiempo, posee actividad de agrupamiento de RAC in vivo y que no es escindido por la neurotripsina in vivo.

45 La actividad in vivo, tal como se usa en la presente solicitud, englobará efectos que van desde la prevención de la pérdida de peso corporal y la pérdida de fuerza muscular hasta el completo restablecimiento del peso corporal y la fuerza muscular en ratones sarcopénicos (muslik M491S).

La expresión «fragmento de agrina», tal como se usa en la presente solicitud, comprende la forma secretada o transmembránica de la agrina, en la que los aminoácidos básicos arginina y/o lisina en, al menos, el sitio de reconocimiento β y posiblemente también en el sitio α para la neurotripsina mutan en cualquier otro aminoácido, lo que genera una forma de agrina resistente al menos en parte a la neurotripsina. Engloba fragmentos que comprenden al menos el dominio LG3 y LG2 de la agrina, pero también fragmentos que además incluyen al menos otro dominio que se encuentra de forma natural en la agrina, por ejemplo los dominios LG1 y EG1-4.

55 Otra posibilidad consiste en modificar químicamente el fragmento de agrina de manera que se impida la escisión proteolítica por parte de la neurotripsina o de proteasas serínicas similares a la neurotripsina.

Además los fragmentos de agrina incluidos en la descripción están destinados a contener cualquier aminoácido insertado de manera natural o no en los sitios de ajuste «y» y «z».

60 En una forma de realización, la invención se ocupa de los fragmentos de agrina C-terminales que contienen al menos el sitio β de escisión de la neurotripsina, en los que este sitio de escisión se modifica de manera que la neurotripsina o proteasas similares a la neurotripsina no son capaces de escindirlo. Un fragmento de agrina modificado especialmente preferido denominado como C44 y4z8K/A resistente a la neurotripsina comprende la secuencia de aminoácidos según

la SEQ ID N°:3 que se muestra en la fig. 2b. La abreviatura A/K hace referencia a la mutación de K (lisina) en A (alanina) en el sitio de escisión β . Otros fragmentos de agrina modificados preferidos denominados C44 y0z8K/A (humano), C44 y0z8K/A (de ratón), C44 y4z0K/A (humano), C44 y4z8K/A (humano) comprenden las secuencias de aminoácidos según las SEQ ID N°: 11 a 14 que se muestran en las figuras 7 a 10.

5

Dichos fragmentos de agrina se pueden obtener mediante procedimientos habituales de ingeniería recombinante, tal como se describe en los ejemplos del fragmento de agrina C44 y4z8K/A. Para sus experimentos, los solicitantes usaron un fragmento que se purificó mediante un His8 introducido en la zona N-terminal. El fragmento, denominado en el texto C44K/A, posee una secuencia según la SEQ ID N°: 4.

10

La única diferencia entre la C44 y4z8K/A y la C44K/A resistentes a la neurotripsina reside en que la última proteína incluye además el marcador His-8 que no se eliminó antes de someter a ensayo el fragmento.

15

Como se muestra en los ejemplos, los fragmentos de agrina modificados según la invención son capaces de inducir el desarrollo muscular en ratones aquejados de sarcopenia. Por tanto, un aspecto importante de la presente invención consiste en el uso como medicamento de los fragmentos de agrina que son objeto de reivindicación.

20

Otro aspecto de la invención consiste en el uso del fragmento de agrina modificado para el tratamiento, o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neuromusculares o enfermedades de nervios, músculos y uniones neuromusculares, incluidas, entre otras: sarcopenia, debilidad muscular, fragilidad, atrofia muscular y distrofia muscular, miastenia, miotonía, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.

25

Además de las enfermedades mencionadas, el fragmento de agrina modificado se puede usar, en general, para el tratamiento de todas la enfermedades en las que el nivel de neurotripsina es elevado debido a, p. ej., la sobreexpresión.

30

Otro aspecto consiste en el tratamiento de la atrofia por inactividad de los músculos (atrofia muscular), con pérdida de masa y fuerza, que puede producirse tras un periodo prolongado de inmovilidad. Entre los ejemplos de inmovilidad prolongada se encuentran el reposo en cama prolongado, o tener un miembro enyesado o la ventilación mecánica en pacientes aquejados de enfermedades pulmonares. También existen muchas enfermedades y trastornos que provocan la atrofia de la masa muscular. Por ejemplo, enfermedades como el cáncer o el SIDA inducen un síndrome de consunción corporal denominado «caquexia», que resulta notable por la severa atrofia muscular que se observa. Este tipo de atrofia se puede revertir con ejercicio, a menos que el trastorno sea severo. Se sabe que la atrofia por inactividad provoca la remodelación en la unión neuromuscular. La plasticidad y los cambios neuromusculares observados son

35

característicos no solo de las UNM envejecidas (sarcopénicas), sino también de la atrofia por inactividad. La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un fragmento de agrina modificado según la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable para tratar la sarcopenia y enfermedades musculares. Dicho tratamiento se puede combinar con enfoques terapéuticos que incluyen el entrenamiento con movimientos activos o la optimización nutricional.

40

Se ha observado que un modo preferido de administración es la inyección subcutánea. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas para este caso incluyen excipientes que permiten dicha inyección. No obstante, también se contempla la administración de los fragmentos por vía intramuscular, intravenosa, intratecal, oral, transdérmica, transepitelial, intrapulmonar o intranasal. Se pueden usar las siguientes formulaciones o dispositivos: microencapsulamiento, microproyección de liposomas, PEGilación o derivados PEGilados de fragmentos de agrina, o nanopartículas. Además, dichas composiciones farmacéuticas están englobadas en la invención.

45

Breve descripción de los dibujos

50

Fig. 1: muestra una representación esquemática de la estructura de los dominios de la agrina.

Fig. 2a: es una representación esquemática de la agrina C44 resistente a la neurotripsina.

55 Fig. 2b: secuencia de aminoácidos de la agrina C44 y4z8 resistente a la neurotripsina (SEQ ID N°: 3).

Fig. 3: es la representación de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que muestra la purificación de C44K/A (SEQ ID N°: 4) a través de IMAC.

60 Fig. 4: es la representación de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que muestra la digestión proteolítica limitada de C44K/A y agrina humana C44 y4z8 con neurotripsina humana.

Fig. 5: es una gráfica que muestra la evolución del peso corporal de ratones tratados con C44K/A o vehículo.

65 Fig. 6a,b: muestran la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores en el día 13 del

experimento en ratones de tipo silvestre (WT) de la misma camada y ratones sarcopénicos tratados con C44K/A o vehículo.

Fig. 7: secuencia de aminoácidos de agrina C44 y0z8K/A (h) resistentes a la neurotripsina (SEQ ID N°: 11).

5 Fig. 8: secuencia de aminoácidos de agrina C44 y0z8K/A (m) resistentes a la neurotripsina (SEQ ID N°: 12).

Fig. 9: secuencia de aminoácidos de agrina C44 y4z0 resistentes a la neurotripsina (SEQ ID N°: 13).

10 Fig. 10: secuencia de aminoácidos de agrina C44 y4z8K/A (m) resistentes a la neurotripsina (SEQ ID N°: 11).

Fig. 11: es la representación de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que muestra la digestión proteolítica limitada de fragmentos de C44K/A.

15 Fig. 12: muestra la evolución de los pesos corporales totales de ratones sarcopénicos (491S) tratados con vehículo (vehículo) o C44K/A humana (0,8) o C44K/A de ratón (0,8) y compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo (vehículo de tipo silvestre).

20 Fig. 13a,b: muestran la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores de ratones sarcopénicos tratados con vehículo (vehículo) o C44K/A humana (0,8) o C44K/A de ratón (0,8) y compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo (vehículo de tipo silvestre).

La fig. 1 muestra una representación esquemática de la agrina. La agrina posee un núcleo proteínico de aproximadamente 225 kDa. Se trata de una proteína multidominio compuesta por 9 dominios K (tipo kunitz), 2 dominios LE (tipo laminina-EGF), un dominio SEA (proteína espermática, enterocinasa y agrina), 4 dominios EG (de tipo factor de crecimiento epidérmico) y 3 dominios LG (laminina globular). A ambos lados del dominio SEA, se halla una región rica en serina/treonina (S/T). La agrina se presenta en varias isoformas. La forma secretada contiene una secuencia de señales (SS) que se escinde, seguida de un dominio de agrina N-terminal (NtA). La forma unida a la membrana de tipo II contiene una región transmembránica (TM), seguida directamente por el primer dominio de tipo kunitz. La fracción C-terminal de 75 kDa de la agrina que comienza con el primer dominio EG es necesaria para la plena actividad de la actividad de agrupamiento del receptor de acetilcolina (RAC) en las células musculares, aunque el fragmento más C-terminal de 20 kDa es suficiente para inducir la agregación de RAC a baja potencia. Varios sitios de unión para compañeros de interacción de la agrina, incluidos el α -distroglucano, heparina, algunas integrinas y LRP4 están mapeados a la región C-terminal. Las largas cadenas laterales de heparán sulfato (cadenas en forma de piruleta o «lollipop») constituyen sitios de unión para las proteínas que se unen a la heparina, p. ej., algunos factores de crecimiento. Los «lollipops» indican sitios de glucosilación. Las letras «x», «y» y «z» designan los sitios de escisión alternativos en la región C-terminal de la agrina. En el sitio x (que no aparece en el pollo y la rana), puede haber 0, 3 o 12 aminoácidos, en el sitio «y» puede haber 0 o 4 aminoácidos y en el sitio z puede haber 0, 8, 11 o 19 (8+11) aminoácidos insertados. Las expresiones « α - y β -escisión» indican los dos sitios de escisión de neurotripsina conservados. Las masas aproximadas de los núcleos proteínicos de fragmentos proteolíticos tras la escisión de la neurotripsina se indican arriba.

Las abreviaturas usadas en la fig. 1 tienen los siguientes significados: SS: secuencia de señales; NtA: dominio de agrina N-terminal; TM: segmento transmembránico; K: dominio de tipo kunitz; LE: dominio de laminina de tipo EGF; S/T: segmento rico en serina/treonina; SEA: dominio de proteína espermática, enterocinasa y agrina; EG: dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico; LG: dominio globular de laminina.

La fig. 2a muestra una representación esquemática de un fragmento de agrina modificado usado según la invención. El fragmento contiene los dominios C-terminales LG2, EG4 y LG3 de la agrina. El sitio de β -escisión de la neurotripsina está suprimido.

La fig. 2b muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 3) del fragmento de agrina C44 y4z8K/A resistente a la neurotripsina. El fragmento contiene los dominios C-terminales LG2, EG4 y LG3 de la agrina. El sitio de β -escisión de la neurotripsina está suprimido por la mutación de la lisina en una alanina.

55 Las abreviaturas usadas en la fig. 2 tienen los siguientes significados: LG: dominio globular de laminina; EG: dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico; «y» y «z» indican los sitios de ajuste alternativos de la parte C-terminal de la agrina. β -escisión tachada: mutación en el sitio de β -escisión para la neurotripsina, que aporta al fragmento de agrina la resistencia ante la neurotripsina.

60 La fig. 3 es un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con Sypro Ruby que muestra el avance de la purificación de C44K/A en una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. El sobrenadante del cultivo procedente de células HEK 293 transfectadas con un vector pEAK8 que contiene el gen para C44K/A se cargó en una columna de IMAC de 10 ml marcada con Ni^{2+} . Tras lavar la columna con un tampón adecuado, la proteína ligada se eluyó con un tampón que contenía imidazol 500 mM (5-9). Carril 1: marcador proteínico Precision Plus de Biorad; Carril 2: sobrenadante del

cultivo concentrado; Carril 3: fracciones no retenidas; Carril 4: fracción de lavado; Carriles 5 a 9: fracciones de elución.

La fig. 4 es un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con Sypro Ruby que muestra la digestión proteolítica de C44K/A y agrina C44 y4z8 humana con neurotripsina humana. Se incubó C44K/A o agrina C44 y4z8 humana con neurotripsina humana durante 3,5 horas a 37 °C (1+3) y posteriormente se sometió a electroforesis SDS-PAGE. Como control, se incubaron los fragmentos de agrina con tampón en las mismas condiciones (2+4). La mutación de K en A en el sitio de β -escisión abole eficazmente una escisión del fragmento de agrina. Carril 1: C44K/A con la adición de neurotripsina humana; Carril 2: C44K/A sin la adición de neurotripsina humana; Carril 3: agrina C44 y4z8 humana con la adición de neurotripsina humana; Carril 4: agrina C44 y4z8 humana sin la adición de neurotripsina humana.

La fig. 5 muestra la evolución de los pesos corporales totales de ratones sarcopénicos (491S) tratados con vehículo o C44K/A y compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo (vehículo de tipo silvestre). El peso de los ratones se determinó diariamente a lo largo de todo el experimento hasta el día 22. El peso de los ratones se expresa como un porcentaje de los compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo. El tratamiento comenzó el día 1 y se interrumpió el día 13. La fuerza de agarre se midió el día 13.

Las figs. 6a y b muestran la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores de ratones sarcopénicos tratados con vehículo (vehículo) o C44K/A (C44K/A). La fuerza de agarre se mide el día 13. La fuerza de agarre de los diferentes grupos de tratamiento se indica como un porcentaje de los ratones de la misma camada de tipo silvestre tratados con vehículo. Las desviaciones estándar se indican como barras de error. (N = 5 para cada grupo).

La fig. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la agrina humana C44 y0z8K/A (h) resistente a la neurotripsina (SEQ ID N°: 11).

La fig. 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la agrina de ratón C44 y0z8K/A (m) resistente a la neurotripsina (SEQ ID N°: 12).

La fig. 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la agrina humana C44 y4z0K/A resistente a la neurotripsina (SEQ ID N°: 13).

La fig. 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la agrina de ratón C44 y4z8K/A (m) resistente a la neurotripsina (SEQ ID N°: 14).

Todos los fragmentos que se muestran en las figs. 7 a 10 contienen los dominios C-terminales LG2, EG4 y LG3 de la agrina. El sitio de β -escisión de la neurotripsina es suprimido por la mutación de la lisina en una alanina.

La fig. 11 es un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con Sypro Ruby que muestra la digestión proteolítica de otros fragmentos C44 en un ensayo de neurotripsina. Los diferentes fragmentos C44 que se muestran en las figs. 7 a 10 y la agrina humana C44 y4z8K/A (fig. 2b) se incubaron en ensayos con (hNT+) y sin neurotripsina humana (hNT-) durante 3,5 horas a 37 °C y posteriormente se sometieron a electroforesis SDS-PAGE. Como control, se incubaron en las mismas condiciones un marcador de preescisión y agrina humana C44y0z0 sin mutación en el sitio de β -escisión. De nuevo, resulta evidente que la mutación de K en A en el sitio de β -escisión abole eficazmente una escisión de los fragmentos de agrina mutados causada por la neurotripsina. Carril 1: marcador de preescisión; Carril 2: C44 y0z0 sin mutación (hNT-); Carril 3: C44 y0z0 sin mutación (hNT+); Carril 4: agrina humana C44 y4z0K/A (hNT-); Carril 5: agrina humana C44 y4z0K/A (hNT+); Carril 6: agrina humana C44 y0z8K/A (hNT-); Carril 7: agrina humana C44 y0z8K/A (hNT+); Carril 8: agrina de ratón C44 y0z8K/A (hNT-); Carril 9: agrina de ratón C44 y0z8K/A (hNT+); Carril 10: agrina humana C44 y4z8 (hNT-); Carril 11: agrina humana C44 y4z8 (hNT+); Carril 12: agrina de ratón C44 y4z8K/A (hNT-) y Carril 13: agrina de ratón C44 y4z8K/A (hNT+).

La fig. 12 muestra la evolución de los pesos corporales totales de ratones sarcopénicos (491S) tratados con vehículo (vehículo) o C44 y0z8K/A humana o C44 y0z8K/A de ratón y compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo (vehículo de tipo silvestre). El peso de los ratones se determinó diariamente a lo largo de todo el experimento hasta el día 22. El peso de los ratones se expresa como un porcentaje de los compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo. El tratamiento comenzó el día 1 y se interrumpió el día 13.

Las figs. 13a y b muestran la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores de ratones sarcopénicos tratados con vehículo (vehículo) o C44 y0z8K/A humana o C44 y0z8K/A de ratón y compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo (vehículo de tipo silvestre). La fuerza de agarre se mide el día 13. La fuerza de agarre de los diferentes grupos de tratamiento se indica como un porcentaje de los ratones de la misma camada de tipo silvestre tratados con vehículo. Las desviaciones estándar se indican como barras de error. (N = 5 para cada grupo).

Descripción detallada de la invención

Los solicitantes fueron los primeros en mostrar que los ratones sarcopénicos, además de las deficiencias conocidas,

también presentan un declive en la masa corporal magra (fig. 5) y una fuerza de agarre reducida en comparación con ratones sanos de tipo silvestre (fig. 6).

Partiendo de este hecho, los solicitantes fueron capaces de mostrar que la agrina C44K/A resistente a la neurotripsina que se muestra, p. ej., en la fig. 2a y que comprende la secuencia que se muestra en la fig. 2b es capaz de aumentar el peso y la fuerza de agarre de ratones sarcopénicos, es decir, ratones que sobreexpresan la neurotripsina tal como se muestra en las figs. 5 y 6a,b.

El efecto reconstitutorio se logra tras la administración subcutánea de fragmentos C44K/A. El efecto no se limita localmente al sitio de la inyección, sino que posee un efecto beneficioso en la masa corporal total y la fuerza muscular. Los ratones sarcopénicos tratados son más fuertes y poseen una mayor fuerza de agarre tanto en las extremidades anteriores como en las posteriores.

La administración de C44K/A también facilitará la reinervación de las fibras musculares en agrupamientos ectópicos de RAC y dará lugar a una estabilización y maduración de las UNM recién formadas. De este modo, la administración de C44K/A también resultará beneficiosa en procesos de rehabilitación en los que sea necesaria la reinervación de fibras musculares o músculos.

A diferencia de la agrina humana resistente a la neurotripsina reivindicada en el presente documento, los fragmentos de agrina que presentan sitios de escisión intactos para la neurotripsina (como se describe en el documento WO 97/21811) no resultarán beneficiosos, ya que la neurotripsina los degrada rápidamente y perderán su actividad de agrupamiento de RAC.

La neurotripsina escinde la agrina (fig. 1) en dos sitios. El sitio de α -escisión se sitúa entre la arginina 1102 (R1102) y la alanina 1103 (A1103). El sitio de β -escisión está situado entre la lisina 1859 (K1859) y la serina 1860 (S1860; numeración correspondiente a la agrina humana NP_940978). La escisión de la agrina por parte de la neurotripsina en el sitio β genera un fragmento de aproximadamente 20 kDa (agrina C22) que va desde S1860 al extremo terminal-C.

La agrina humana resistente a la neurotripsina usada según la invención es un fragmento de agrina C-terminal consistente en los dominios LG2, EG4 y LG3 de agrina y que alberga el sitio de β -escisión inactivado para la neurotripsina. Su residuo de lisina P1 (K1859) muta en una alanina, lo cual hace que la neurotripsina deje de ser capaz de escindir la agrina en este sitio (fig. 3).

La agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina según se define en la presente invención es el fragmento de agrina C-terminal de 44 kDa de la SEQ ID N°: 3 en el que el aminoácido básico lisina 1859 (NP_940978) (o lisina 227 en SEQ ID NO: 3) muta en una alanina, lo que da lugar a un fragmento de agrina, que no es escindible por la neurotripsina. Este fragmento también puede carecer de inserciones en el sitio «y» situado entre los aminoácidos P1751 y V1752 (NP_940978) o no tener inserciones, o las inserciones de 8, 11 o 19 aminoácidos en el sitio z situado entre los aminoácidos S 1884 y E1885 (NP_940978), o combinaciones de los mismos. Las secuencias insertadas en el sitio «y» pueden ser KSRK (y4, SEQ ID NO: 5), VLSASHPLTVSGASTPR (y17, SEQ ID NO: 6) y KSRKVLSASHPLTVSGASTPR (y21, SEQ ID NO: 7) y en el sitio z ELANEIPV (z8, SEQ ID NO: 8), PETLDGALHS (z11, SEQ ID NO: 9) o ELANEIPVPETLDGALHS (z19, SEQ ID NO: 10, una combinación de la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9).

Si en la presente solicitud se hace referencia a la agrina humana C44 y4z8, dicho fragmento de agrina corresponderá al fragmento que se muestra en la SEQ ID N°: 3, con la única diferencia de que la alanina en la posición 227 de la secuencia que se muestra es sustituida por una lisina en la agrina humana C44 y4z8.

En la presente invención, la expresión «agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina» también comprende variantes agrínicas de la proteína definida por la SEQ ID N°: 3 en la que no se introduce ninguna inserción en el sitio «y», o no se introduce ninguna inserción en el sitio z, o en el que, en lugar de la inserción de 8 aminoácidos, se inserta en el sitio z una inserción de 11 o 19 aminoácidos correspondientes a la SEQ ID N°: 9 y SEQ ID N°: 10. Esto incluye todas las posibles combinaciones de variantes generadas por la introducción de los aminoácidos posibles en los sitios «y» y «z».

El término «agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina» también incluye fragmentos de agrina de SEQ ID N°: 3 que contienen aminoácidos adicionales en los extremos N-terminal o C-terminal. Dichos aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal están, por ejemplo, presentes debido al procedimiento de preparación mediante síntesis recombinante y expresión en células adecuadas. Un ejemplo de dicha proteína incluido en la definición de «agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina» es la proteína C44K/A de SEQ ID N°: 4 preparada según el EJEMPLO 1, que contiene una marca His8 con un sitio de proteasa Prescission para simplificar la purificación (fig. 4).

También se incluyen proteínas que no pueden ser escindidas por la neurotripsina y que contienen elongaciones en el extremo N-terminal por uno o más dominios de agrina hasta el extremo N-terminal natural de la agrina, así como variantes proteínicas glucosiladas o modificadas de otro modo postraduccionalmente, enzimáticamente o químicamente de agrina humana resistente a la neurotripsina.

Como se muestra en los ejemplos, la agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina posee la capacidad de restituir el fenotipo sarcopénico causado por la sobreexpresión de la neurotripsina.

5 Debido a que la elevada secreción no natural de neurotripsina por parte de la neurona motriz provoca la sobredigestión de agrina que forma un complejo con LRP4, se abole una señalización apropiada para inducir el agrupamiento de RAC a través de la MuSK. Esto da lugar a una pérdida de la UNM y, posteriormente, a una pérdida de la fibra muscular correspondiente y a la sarcopenia. La agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina es capaz de funcionar como agonista de la LRP4, estimulando la ruta de la MuSK. Ya que la neurotripsina no puede producir ninguna escisión, el
10 complejo permanece estable y la señalización se mantiene durante un largo periodo. Esto da lugar a la expresión de RAC y el mantenimiento de la UNM. La agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina resulta valiosa para el tratamiento de la sarcopenia causada por un acceso de la neurotripsina y también puede ser útil en enfermedades en las que se aprecia una desestabilización general de la UNM.

15 El nuevo mecanismo subyacente a la eficacia de la agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina para el tratamiento de la sarcopenia consiste en la terapia de un desajuste de orden nervioso y no en el intento de influir en el metabolismo de las fibras musculares o de todo el músculo.

La invención también se refiere al uso de la agrina humana resistente a la neurotripsina para el tratamiento de
20 rehabilitación tras una lesión en la médula espinal, por ejemplo para la mejora de terapias dependientes del uso. Dichas terapias se pueden mejorar mediante la agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina, debido a su capacidad para fomentar el agrupamiento de RAC, manteniendo intactas las UNM o fomentando la fijación de las terminaciones nerviosas en crecimiento a los agrupamientos ectópicos de RAC preformados de la fibra muscular, lo que facilita la generación de nuevas UNM necesarias para realizar movimientos.

25 También se describe la producción de agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina en la que un ADN codificante para la agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina se expresa en sistemas de expresión adecuados y la proteína resultante se purifica posteriormente. Varios sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos resultan adecuados para la producción y la secreción de agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina. Los
30 sistemas de expresión procarióticos incluyen, entre otros, la expresión en *E. coli*. Los sistemas de expresión eucarióticos incluyen la expresión en células de mieloma de ratón, expresión mediada por baculovirus en células de insecto, así como la expresión en células de riñón embrionario humano (HEK), expresión transitoria en células ováricas de hámster chino (CHO) y la expresión estable en *Pichia pastoris*. Estos sistemas ofrecen la ventaja de que se pueden adaptar con facilidad a las condiciones libres de suero para reducir la cantidad de proteínas contaminantes en el sobrenadante y se
35 pueden adaptar a la producción a gran escala. Además, se pueden usar diversas líneas celulares, incluidas las células HEK293T y HEK293-, células COS, células CHO, células HeLa, células H9, células Jurkat, células NIH3T3, células C127, células CV1, células CAP o células SF.

Para la purificación de la agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina, se aplican tecnologías convencionales
40 de purificación de proteínas. La proteína marcada con His se puede purificar mediante IMAC, pero también se puede usar la cromatografía de intercambio iónico o la purificación por afinidad mediante una columna de heparina. También se puede usar la purificación a través de un anticuerpo generado contra la parte C-terminal de la agrina. Después, la proteína eluida se puede purificar aún más mediante una columna de hidroxipatita o mediante filtración en gel.

45 Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no están limitados a la invención. Los expertos en la materia que lean estos ejemplos serán capaces de aplicar otras condiciones afines y estas también quedarán dentro del alcance de la invención.

EJEMPLOS:

50 **Ejemplo 1:** Clonación de fragmento de agrina humana C-terminal 44-kd resistente a la neurotripsina (C44K/A)

Inicialmente, se clonó agrina humana y0z0 de longitud completa pero carente del dominio NtA N-terminal (la deltaNTA de agrina humana y0z0 comienza en la posición K156 en la secuencia de proteína con número de acceso NP_940978)
55 mediante PCR en el vector pEAK8 que contiene la secuencia codificante para la señal de secreción de calsintena-1 humana, (Reif y col., 2007) a través de cebadores y sitios de restricción apropiados. Como plantilla para la agrina humana, se usó el vector pCMV-XL5-agrina (adquirido en Origene, EE. UU.).

En dos etapas posteriores, los codones correspondientes requeridos para las inserciones y4z8 fueron introducidos por
60 mutagénesis dirigida al sitio, mediante técnicas convencionales, lo que dio lugar al vector pEAK8 que contiene la deltaNTA de agrina humana y4z8 de longitud completa.

Usando este vector como plantilla, el gen que codifica para el fragmento C-terminal de 44 kd de agrina humana fue amplificado introduciendo la región codificante para un marcador de His8 y un sitio de escisión de proteasa Prescission
65 en el extremo N-terminal de la proteína traducida.

La forma resistente a la neurotripsina de la agrina humana C44K/A se generó en una etapa de mutagénesis de cambio rápido con el uso de cebadores que introducen el codón para una alanina en el lugar del codón para la lisina en el sitio-β de escisión de la agrina.

5

Este plásmido genera una proteína con la secuencia de SEQ ID N°: 4 en el sobrenadante del cultivo de células transfectadas (sin secuencia de señales) con los aminoácidos de la fracción de agrina que comienza con la leucina 21.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de agrina humana C44 y C44K/A resistente a la neurotripsina

10

Se peletizaron 500 ml de células HEK 293 cultivadas en medio Excell 293 hasta alcanzar una densidad de 1×10^6 células/ml, mediante centrifugado en una centrífuga Sorvall RC5C a 100 xg durante 30 minutos. Las células se resuspendieron en 500 ml de medio RPMI1640 precalentado a 37 °C. En 25 ml de NaCl 150 mM, se diluyeron 1,25 mg de pEAK8 que contiene el inserto para la expresión de la agrina humana C44 y4z8 resistente a la neurotripsina. En 25 ml de NaCl 150 mM, se diluyeron 3,75 mg de imina de polietileno (PEI), 25 kDa. Ambas soluciones se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se añadió esta solución a la suspensión de células que se trasladó a un matraz de agitación de 1000 ml. La suspensión de células se incubó durante 7 días a 75 rpm en una plataforma de agitación colocada en un incubador con 5% de CO₂ y 37 °C en atmósfera humidificada.

15

Tras 7 días, se recolectó el sobrenadante del cultivo mediante centrifugado a 5000 rpm en una centrífuga Sorvall RC5C. Las partículas restantes se eliminaron por filtrado a través de un dispositivo de filtrado estéril Millipore de 0,22 μm. El sobrenadante del cultivo filtrado se concentró 10 veces mediante un cartucho PLCGC Pellicon de flujo tangencial de corte de peso molecular de 10 kDa y se dializó al menos 1:1000 contra MOPS 20 mM con pH 8,5, NaCl 400 mM. El dializado se sometió a cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), aprovechando el marcador His8 y usando una columna de mesa His Select de 10 ml marcada con Ni²⁺. Tras cargar el sobrenadante del cultivo celular concentrado y dializado, la columna se lavó con 100 ml de tampón de diálisis y la proteína ligada se eluyó con 5 veces 10 ml de tampón de diálisis que contenía imidazol 500 mM. El éxito de la purificación se evaluó mediante SDS-PAGE (FIG D). Las fracciones positivas se combinaron y se concentraron 10 veces con un dispositivo de filtrado AMICON con corte de peso molecular de 30 kDa a 3000 x g en una centrífuga Sigma 4K15 y se dializó 1:10000 contra MOPS 20 mM, pH 8,5, NaCl 200 mM. La concentración de la C44K/A purificada se determinó mediante espectroscopia por UV con el coeficiente de extinción de 0,725 cm²/mg.

30

Ejemplo 3: Eliminación del marcador His8 mediante la escisión de proteasa PreScission.

En caso de que se debiera eliminar el marcador His8, el tampón de 0,5 ml de solución de proteína se intercambiaba con Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, Na₂EDTA 1 mM mediante una columna NAP-5 preequilibrada con dicho tampón. La solución de proteína se eluyó en 1 ml del mismo tampón. Se añadió 1 μl de DTT 1M a la solución de proteína y se mezcló volteando el tubo varias veces. Se añadieron 20 μl de proteasa PreScission (1U/μl) y se mezcló el contenido del tubo agitándolo varias veces. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C. Se equilibró una columna de 0,5 ml de glutatión-sefarosa de flujo por gravedad con 5 ml de PBS complementados con DTT 1 mM. La solución de proteínas digerida se cargó y se recogió la fracción no retenida. La columna se lavó con 3 veces 1 ml de PBS complementado con DTT 1 mM y se recogió la fracción no retenida en el mismo tubo que la anterior fracción no retenida. Las fracciones no retenidas que se recogieron fueron dializadas 2 veces durante 2 horas contra 5 l de MOPS 20 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM para eliminar el DTT y la EDTA.

45

Para eliminar el marcador His8 escindido, se llevó a cabo una segunda IMAC. Una columna FF de quelante de sefarosa de 1 ml previamente marcada con iones Ni²⁺ se equilibró con 5 ml de MOPS 20 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM. La solución de proteínas dializada se aplicó sobre la columna y se recogió la fracción no retenida. La columna se lavó con 3 veces 1 ml de MOPS 20 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM y se recogió la fracción no retenida en el mismo tubo. Las fracciones combinadas se concentraron con un concentrador AMICON con un corte de peso molecular de 20 kDa hasta 0,5 ml y el tampón se intercambiaba mediante una columna NAP-5 preequilibrada con MOPS 20 mM, pH 8,5, NaCl 200 mM. La concentración se determinó mediante espectroscopia por UV usando el coeficiente de extinción de 0,725 cm²/mg. La proteína se usó recién preparada para continuar experimentando o se almacenó a -80 °C hasta su uso. La secuencia de proteína de la proteína correspondiente corresponde a la parte de la SEQ ID N°: 3 que empieza desde la glicina 19.

55

Ejemplo 4: Digestión in vitro de C44 y C44K/A mediante neurotripsina humana.

a) Para demostrar que la neurotripsina no es capaz de digerir la agrina humana C44 y4z8K/A resistente a la neurotripsina, la proteína se sometió a un ensayo de neurotripsina. Como control, se usó agrina humana C44 y4z8. Los sustratos de agrina C44 se usaron en concentraciones de 1 μM en el ensayo y se añadió neurotripsina humana. La reacción se llevó a cabo en MOPS 20 mM, pH 8,3, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, PEG 6000 al 0,1%. La digestión se efectuó durante 6 horas a 37 °C. Las preparaciones se cargaron en un gel de poli(acrilamida) NuPAGE SDS al 4-12% y se tiñó con Sypro Ruby (fig. 4).

60

b) En otro ensayo similar al de a) se mostró que los fragmentos C44K/A que se muestran en las figs. 2b y 7-10 no son

65

digeridos por la neurotripsina (fig. 11).

Ejemplo 5: Administración de C44K/A humana resistente a la neurotripsina humana en ratones.

5 El modelo de ratones sarcopénicos usado en el experimento consiste en sobreexpresores de neurotripsina estimulados con thy-1 en fondo de C57BL/6NCRL, (Stephan y col., 2008) y sus compañeros de camada de tipo silvestre. Se incluyeron animales tanto hembras como machos, ya que en los ratones jóvenes de esta edad no existen diferencias de peso y fuerza muscular entre ambos sexos. Los ratones se incorporaron al experimento en P8 (ocho días después de nacer).

10 Se usaron tres grupos con 3 ratones por grupo: 1. Ratones de tipo silvestre tratados con vehículo. 2. Ratones sarcopénicos (m491S) tratados con C44K/A. 3. Ratones sarcopénicos tratados con vehículo.

15 Se inyecta subcutáneamente a los ratones C44K/A o vehículo con una dosis total de 6,4 mg/kg/día. La administración comenzó el día 1 y duró hasta el día 13. Se midió diariamente el peso de todos los ratones del experimento. Se promedió el peso para cada grupo de tratamiento y se registró en una gráfica para cada día de experimento (FIG. 5). Al comienzo del experimento, ya se observa una ligera reducción en el peso corporal en los ratones sarcopénicos. El tratamiento de la sarcopenia con C44K/A dio lugar a un aumento de peso considerable en comparación con los ratones tratados con vehículo. Los ratones sarcopénicos tratados como C44K/A recuperaron completamente y superaron la

20 misma evolución observada en los compañeros de camada de tipo silvestre. En humanos, los pacientes aquejados de fragilidad sufren una pérdida de peso de más de 5 kg al año (Bauer y Sieber, 2008; Lauretani y col., 2003). Esto corresponde a una pérdida de aproximadamente el 7% del peso corporal total. Los ratones sarcopénicos tratados con vehículo de control mostraron una marcada reducción en los pesos corporales. Durante el experimento, los ratones sarcopénicos experimentaron una pérdida de peso de aproximadamente el 5%.

25 **Ejemplo 6:** Medición de la fuerza de agarre.

En el día 13 del experimento descrito en el ejemplo 5, se midió la fuerza de agarre en las extremidades anteriores y posteriores con un medidor de fuerza digital (Columbus Instruments, Columbus OH) que retiene el pico de fuerza aplicada mediante calibradores de fuerza de precisión. El medidor de fuerza se fijó a una base sólida y se conectó con un transductor de fuerza a una barra con forma triangular de aproximadamente 1 mm de diámetro. Se recogieron datos en línea a través de una conexión RS232 con un ordenador, se almacenaron en un archivo .dat mediante el software Grip Strength Meter (Columbus Instruments) y se trasladaron a Excel para la gestión y el análisis estadístico de los datos. Se usaron los gramos (g) como unidad de medida de la fuerza máxima. Antes de la medición, los ratones se trasladan a la sala del experimento y se les deja aclimatarse durante 10 minutos. Se dejó a cada ratón que agarrara con sus patas delanteras una barra metálica, con un diámetro de aproximadamente 3 mm. Posteriormente, se aproximó el ratón a la barra dando la espalda al medidor de fuerza y se permitió que agarrara el alambre de la barra con sus patas delanteras o sus patas traseras. Se tiró de la cola del ratón, en paralelo a la barra, hacia el medidor de fuerza, con una velocidad de aproximadamente 10 cm/s.

40 Se siguió tirando a velocidad constante hasta que las extremidades anteriores respectivamente de la extremidad anterior del ratón se soltaron. Una sesión experimental consistía en 5 pruebas para la fuerza de agarre de la extremidad posterior. Entre las distintas pruebas, se dejó descansar a los ratones un periodo de aproximadamente 1 minuto. Al menos un día antes de la sesión experimental en curso, los ratones fueron entrenados con el procedimiento descrito.

45 Cada sesión experimental se llevó a cabo a ciegas, para evitar cualquier sesgo experimental no deseado.

Los datos se analizaron del siguiente modo: Para cada ratón, se excluyeron los valores más alto y más bajo y se promediaron los 3 valores restantes. Posteriormente, los datos se promediaron para cada grupo de tratamiento y se normalizaron con respecto al grupo de tipo silvestre tratado con vehículo.

50 En el día 13, los ratones sarcopénicos tratados con vehículo han perdido aproximadamente el 20% de la fuerza muscular en comparación con el tipo silvestre, mientras que los ratones tratados con C44K/A presentan una fuerza de agarre similar a la del tipo silvestre tratado con vehículo.

55 En humanos, la disminución de la fuerza muscular es aproximadamente del 20% al 40% cuando se comparan adultos de alrededor de 20 años de edad con individuos de alrededor de 70 años y puede aumentar por encima del 50% cuando se compara con individuos de más de 90 años (Bauer y Sieber, 2008; Lauretani y col., 2003). En este ejemplo, los solicitantes demuestran que se evitó una reducción en la fuerza de agarre del 20% alrededor del día 14.

60 Esta es la primera vez que se ha demostrado que un fragmento de agrina posee actividad in vivo. Tras la administración subcutánea, la proteína C44K/A se distribuye en el cuerpo y ejerció un efecto beneficioso en los ratones que presentan síntomas similares a los de la sarcopenia.

Ejemplo 7: Administración de C44 y0z8K/A resistente a la neurotripsina y (agrina de ratón c44 y0z8K/A) en ratones.

65

El modelo de ratones sarcopénicos usado de nuevo en el experimento (como en el ejemplo 5) consiste en sobreexpresores de neurotripsina estimulados con thy-1 en fondo de C57BL/6NCRL, (Stephan y col., 2008) y sus compañeros de camada de tipo silvestre. Se incluyeron animales tanto hembras como machos, ya que en los ratones jóvenes de esta edad no existen diferencias de peso y fuerza muscular entre ambos sexos. Los ratones se incorporaron al experimento en P8 (ocho días después de nacer).

Se usaron cuatro grupos con 4 ratones por grupo: 1. Ratones de tipo silvestre tratados con vehículo. 2. Ratones sarcopénicos (m491S) tratados con C44K/A(0,8). 3. Ratones sarcopénicos (m491S) tratados con agrina de ratón C44(0,8)K/A. 4. Ratones sarcopénicos tratados con vehículo.

Se inyecta subcutáneamente a los ratones una dosis total de 20 mg/kg/día. La administración comenzó el día 1 y duró hasta el día 13. Se midió diariamente el peso de todos los ratones del experimento. Se promedia el peso para cada grupo de tratamiento y se registra en una gráfica para cada día de experimento. Se da el peso relativo en porcentajes en comparación con el tipo silvestre tratado con vehículo para cada grupo de tratamiento (FIG. 12). El tratamiento de ratones sarcopénicos con C44y0z8K/A humana o C44y0z8K/A de ratón dio lugar a un aumento de peso considerable en comparación con los ratones sarcopénicos tratados con vehículo. Los ratones sarcopénicos tratados como C44y0z8K/A recuperaron completamente y superaron la misma evolución que se observó en los compañeros de camada de tipo silvestre. En humanos, los pacientes aquejados de fragilidad sufren una pérdida de peso de más de 5 kg al año (Bauer y Sieber, 2008; Lauretani y col., 2003). Esto corresponde a una pérdida de aproximadamente el 7% del peso corporal total. Los ratones sarcopénicos tratados con vehículo de control mostraron una marcada reducción en los pesos corporales. Durante el experimento, los ratones sarcopénicos experimentaron una pérdida de peso de aproximadamente el 5%.

Ejemplo 8: Medición de la fuerza de agarre

La medición se realizó del modo que se describe en el Ejemplo 6.

En las figs. 13a y b se muestra la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores de ratones sarcopénicos tratados con vehículo (vehículo) o C44 y0z8K/A humana o C44 y0z8K/A de ratón y compañeros de camada de tipo silvestre tratados con vehículo (vehículo de tipo silvestre). La fuerza de agarre se mide el día 13. La fuerza de agarre de los diferentes grupos de tratamiento se indica como un porcentaje de los ratones de la misma camada de tipo silvestre tratados con vehículo. Las desviaciones estándar se indican como barras de error. (N = 5 para cada grupo).

35 Lista de referencias

1. Bauer, J. M. y Sieber, C. C.(2008). Sarcopenia and frailty: a clinician's controversial point of view. *Exp. Gerontol.* 43, 674-678.
2. Bezakova, G. y Ruegg, M. A. (2003). New insights into the roles of agrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 295-308.
3. Gschwend, T. P., Krueger, S. R., Kozlov, S. V., Wolfer, D. P. y Sonderegger, P. (1997). Neurotrypsin, a novel multidomain serine protease expressed in the nervous system. *Mol. Cell Neurosci.* 9, 207-219.
4. Lauretani, F., Russo, C. R., Bandinelli, S., Bartali, B., Cavazzini, C., Di, I. A., Corsi, A. M., Rantanen, T., Guralnik, J. M. y Ferrucci, L. (2003). Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl. Physiol* 95, 1851-1860.
5. Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., ttie-Bitach, T. y col. (2002). Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 298, 1779-1781.
6. Reif, R., Sales, S., Hettwer, S., Dreier, B., Gisler, C., Wolfel, J., Luscher, D., Zurlinden, A., Stephan, A., Ahmed, S. Y col. (2007). Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. *FASEB J* 21, 3468-3478.
7. Song, Y. y Balice-Gordon, R. (2008). New dogs in the dogma: Lrp4 and Tid1 in neuromuscular synapse formation. *Neuron* 60, 526-528.
8. Stephan, A., Mateos, J. M., Kozlov, S. V., Cinelli, P., Kistler, A. D., Hettwer, S., Rulicke, T., Streit, P., Kunz, B. y Sonderegger, P. (2008). Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB J*.

En las realizaciones ejemplares, la invención hace referencia a:

65

En una primera realización, un fragmento de agrina modificado con actividad in vivo, que comprende al menos los dominios LG2 y LG3 de la agrina humana o de ratón en forma entrelazada covalentemente y modificados de manera que la neurotripsina es incapaz de escindir el fragmento para su uso como medicamento.

- 5 En una segunda realización, el fragmento de agrina modificado según la primera realización, caracterizado porque su sitio de β -escisión se ha suprimido o modificado.

En una tercera realización, el fragmento de agrina modificado según la primera realización, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 3

10

En una cuarta realización, un uso del fragmento de agrina según la primera realización para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular que afecta a los músculos o enfermedades de los nervios, músculos y uniones neuromusculares.

- 15 En una quinta realización, el uso según la cuarta realización, caracterizado porque las enfermedades neuromusculares que afectan a los músculos o enfermedades de los nervios, músculos y uniones neuromusculares incluyen sarcopenia, debilidad muscular, fragilidad, atrofia muscular y distrofia muscular, miastenia, miotonía, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.

- 20 En una sexta realización, el fragmento de agrina modificado según la primera realización para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la neurotripsina, especialmente enfermedades con niveles elevados de neurotripsina.

- 25 En una séptima realización, el fragmento de agrina modificado según la primera o la sexta realización para su uso en el tratamiento de enfermedades neuromusculares o enfermedades de los nervios, músculos y uniones neuromusculares.

- 30 En una octava realización, el fragmento de agrina modificado según la séptima realización, caracterizado porque las enfermedades neuromusculares o enfermedades de los nervios, músculos y uniones neuromusculares incluyen sarcopenia, debilidad muscular, fragilidad, atrofia muscular y distrofia muscular, miastenia, miotonía, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.

En una novena realización, el fragmento de agrina modificado según la primera realización para su uso en el tratamiento de la atrofia muscular por inactividad o el síndrome de consunción corporal.

- 35 En una décima realización, una composición farmacéutica que comprende un fragmento de agrina según la primera o la segunda realización y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 En una undécima realización, un fragmento de agrina modificado con actividad in vivo, que comprende al menos los dominios LG2 y LG3 de la agrina humana o de ratón en forma entrelazada covalentemente y modificados de manera que la neurotripsina es incapaz de escindir el fragmento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Neurotune AG

<120> Fragmento de agrina modificado capaz de restituir la fuerza muscular para su uso como medicamento

<130> 05252eppc

50

<150> EP09011367.1

<151> 2009-09-04

<160> 14

55

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 184

60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 743 239 T3

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

- <210> 2
- <211> 188
- 5 <212> PRT
- <213> homo sapiens
- <400> 2

ES 2 743 239 T3

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

<210> 3
 <211> 421
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de agrina resistente a la neurotripsina C44 y4z8
 10 <400> 3

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

ES 2 743 239 T3

Glu Ser Pro Lys Ser Arg Lys Val Pro His Thr Val Leu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Glu Pro Leu Tyr Val Gly Gly Ala Pro Asp Phe Ser Lys Leu Ala Arg
 130 135 140
 Ala Ala Ala Val Ser Ser Gly Phe Asp Gly Ala Ile Gln Leu Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Gly Gly Arg Gln Leu Leu Thr Pro Glu His Val Leu Arg Gln Val
 165 170 175
 Asp Val Thr Ser Phe Ala Gly His Pro Cys Thr Arg Ala Ser Gly His
 180 185 190
 Pro Cys Leu Asn Gly Ala Ser Cys Val Pro Arg Glu Ala Ala Tyr Val
 195 200 205
 Cys Leu Cys Pro Gly Gly Phe Ser Gly Pro His Cys Glu Lys Gly Leu
 210 215 220
 Val Glu Ala Ser Ala Gly Asp Val Asp Thr Leu Ala Phe Asp Gly Arg
 225 230 235 240
 Thr Phe Val Glu Tyr Leu Asn Ala Val Thr Glu Ser Glu Leu Ala Asn
 245 250 255
 Glu Ile Pro Val Glu Lys Ala Leu Gln Ser Asn His Phe Glu Leu Ser
 260 265 270
 Leu Arg Thr Glu Ala Thr Gln Gly Leu Val Leu Trp Ser Gly Lys Ala
 275 280 285
 Thr Glu Arg Ala Asp Tyr Val Ala Leu Ala Ile Val Asp Gly His Leu
 290 295 300
 Gln Leu Ser Tyr Asn Leu Gly Ser Gln Pro Val Val Leu Arg Ser Thr
 305 310 315 320
 Val Pro Val Asn Thr Asn Arg Trp Leu Arg Val Val Ala His Arg Glu
 325 330 335
 Gln Arg Glu Gly Ser Leu Gln Val Gly Asn Glu Ala Pro Val Thr Gly
 340 345 350
 Ser Ser Pro Leu Gly Ala Thr Gln Leu Asp Thr Asp Gly Ala Leu Trp
 355 360 365
 Leu Gly Gly Leu Pro Glu Leu Pro Val Gly Pro Ala Leu Pro Lys Ala
 370 375 380
 Tyr Gly Thr Gly Phe Val Gly Cys Leu Arg Asp Val Val Val Gly Arg
 385 390 395 400
 His Pro Leu His Leu Leu Glu Asp Ala Val Thr Lys Pro Glu Leu Arg
 405 410 415
 Pro Cys Pro Thr Pro
 420

<210> 4

<211> 441

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de agrina resistente a la neurotripsina C44K/A

10

<400> 4

ES 2 743 239 T3

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

ES 2 743 239 T3

Leu Arg Ser Thr Val Pro Val Asn Thr Asn Arg Trp Leu Arg Val Val
 340 345 350
 Ala His Arg Glu Gln Arg Glu Gly Ser Leu Gln Val Gly Asn Glu Ala
 355 360 365
 Pro Val Thr Gly Ser Ser Pro Leu Gly Ala Thr Gln Leu Asp Thr Asp
 370 375 380
 Gly Ala Leu Trp Leu Gly Gly Leu Pro Glu Leu Pro Val Gly Pro Ala
 385 390 395 400
 Leu Pro Lys Ala Tyr Gly Thr Gly Phe Val Gly Cys Leu Arg Asp Val
 405 410 415
 Val Val Gly Arg His Pro Leu His Leu Leu Glu Asp Ala Val Thr Lys
 420 425 430
 Pro Glu Leu Arg Pro Cys Pro Thr Pro
 435 440

<210> 5
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inserción en el sitio y de agrina (y4)
 10 <400> 5

Lys Ser Arg Lys
 1

15 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Inserción en el sitio y de agrina (y17)
 <400> 6

Val Leu Ser Ala Ser His Pro Leu Thr Val Ser Gly Ala Ser Thr Pro
 1 5 10 15

25 Arg

<210> 7
 <211> 21
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Inserción en el sitio y de agrina (y21)
 35 <400> 7

Lys Ser Arg Lys Val Leu Ser Ala Ser His Pro Leu Thr Val Ser Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Thr Pro Arg
 20

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Inserción en el sitio z de agrina (z8)

10 <400> 8

Glu Leu Ala Asn Glu Ile Pro Val
 1 5

<210> 9
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Inserción en el sitio z de agrina (z11)

<400> 9

Pro Glu Thr Leu Asp Ser Gly Ala Leu His Ser
 1 5 10

25 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Inserción en el sitio z de agrina (z19)

<400> 10

35

Glu Leu Ala Asn Glu Ile Pro Val Pro Glu Thr Leu Asp Ser Gly Ala
 1 5 10 15
Leu His Ser

<210> 11
 <211> 417
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de agrina resistente a la neurotripsina C44 y0z8 (h)

45 <400> 11

Leu Ala Asp Phe Asn Gly Phe Ser His Leu Glu Leu Arg Gly Leu His
 1 5 10 15
Thr Phe Ala Arg Asp Leu Gly Glu Lys Met Ala Leu Glu Val Val Phe
 20 25 30
Leu Ala Arg Gly Pro Ser Gly Leu Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Thr
 35 40 45

ES 2 743 239 T3

Asp Gly Lys Gly Asp Phe Val Ser Leu Ala Leu Arg Asp Arg Arg Leu
 50 55 60
 Glu Phe Arg Tyr Asp Leu Gly Lys Gly Ala Ala Val Ile Arg Ser Arg
 65 70 75 80
 Glu Pro Val Thr Leu Gly Ala Trp Thr Arg Val Ser Leu Glu Arg Asn
 85 90 95
 Gly Arg Lys Gly Ala Leu Arg Val Gly Asp Gly Pro Arg Val Leu Gly
 100 105 110
 Glu Ser Pro Val Pro His Thr Val Leu Asn Leu Lys Glu Pro Leu Tyr
 115 120 125
 Val Gly Gly Ala Pro Asp Phe Ser Lys Leu Ala Arg Ala Ala Ala Val
 130 135 140
 Ser Ser Gly Phe Asp Gly Ala Ile Gln Leu Val Ser Leu Gly Gly Arg
 145 150 155 160
 Gln Leu Leu Thr Pro Glu His Val Leu Arg Gln Val Asp Val Thr Ser
 165 170 175
 Phe Ala Gly His Pro Cys Thr Arg Ala Ser Gly His Pro Cys Leu Asn
 180 185 190
 Gly Ala Ser Cys Val Pro Arg Glu Ala Ala Tyr Val Cys Leu Cys Pro
 195 200 205
 Gly Gly Phe Ser Gly Pro His Cys Glu Lys Gly Leu Val Glu Ala Ser
 210 215 220
 Ala Gly Asp Val Asp Thr Leu Ala Phe Asp Gly Arg Thr Phe Val Glu
 225 230 235 240
 Tyr Leu Asn Ala Val Thr Glu Ser Glu Leu Ala Asn Glu Ile Pro Val
 245 250 255
 Glu Lys Ala Leu Gln Ser Asn His Phe Glu Leu Ser Leu Arg Thr Glu
 260 265 270
 Ala Thr Gln Gly Leu Val Leu Trp Ser Gly Lys Ala Thr Glu Arg Ala
 275 280 285
 Asp Tyr Val Ala Leu Ala Ile Val Asp Gly His Leu Gln Leu Ser Tyr
 290 295 300
 Asn Leu Gly Ser Gln Pro Val Val Leu Arg Ser Thr Val Pro Val Asn
 305 310 315 320
 Thr Asn Arg Trp Leu Arg Val Val Ala His Arg Glu Gln Arg Glu Gly
 325 330 335
 Ser Leu Gln Val Gly Asn Glu Ala Pro Val Thr Gly Ser Ser Pro Leu
 340 345 350
 Gly Ala Thr Gln Leu Asp Thr Asp Gly Ala Leu Trp Leu Gly Gly Leu
 355 360 365
 Pro Glu Leu Pro Val Gly Pro Ala Leu Pro Lys Ala Tyr Gly Thr Gly
 370 375 380
 Phe Val Gly Cys Leu Arg Asp Val Val Val Gly Arg His Pro Leu His
 385 390 395 400
 Leu Leu Glu Asp Ala Val Thr Lys Pro Glu Leu Arg Pro Cys Pro Thr
 405 410 415
 Pro

ES 2 743 239 T3

<210> 12
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Artificial

5
 <220>
 <223> Fragmento de agrina resistente a la neurotripsina C44 y0z8 (m)

10
 <400> 12

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

ES 2 743 239 T3

Ala Thr Gln Gly Leu Val Leu Trp Ile Gly Lys Val Gly Glu Arg Ala
 275 280 285
 Asp Tyr Met Ala Leu Ala Ile Val Asp Gly His Leu Gln Leu Ser Tyr
 290 300
 Asp Leu Gly Ser Gln Pro Val Val Leu Arg Ser Thr Val Lys Val Asn
 305 310 315
 Thr Asn Arg Trp Leu Arg Val Arg Ala His Arg Glu His Arg Glu Gly
 325 330 335
 Ser Leu Gln Val Gly Asn Glu Ala Pro Val Thr Gly Ser Ser Pro Leu
 340 345 350
 Gly Ala Thr Gln Leu Asp Thr Asp Gly Ala Leu Trp Leu Gly Gly Leu
 355 360 365
 Gln Lys Leu Pro Val Gly Gln Ala Leu Pro Lys Ala Tyr Gly Thr Gly
 370 375 380
 Phe Val Gly Cys Leu Arg Asp Val Val Val Gly His Arg Gln Leu His
 385 390 395 400
 Leu Leu Glu Asp Ala Val Thr Lys Pro Glu Leu Arg Pro Cys Pro Thr
 405 410 415
 Leu

<210> 13
 <211> 413
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de agrina resistente a la neurotripsina C44 y4z0
 10 <400> 13

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

ES 2 743 239 T3

Glu Pro Leu Tyr Val Gly Gly Ala Pro Asp Phe Ser Lys Leu Ala Arg
 130 135 140
 Ala Ala Ala Val Ser Ser Gly Phe Asp Gly Ala Ile Gln Leu Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Gly Gly Arg Gln Leu Leu Thr Pro Glu His Val Leu Arg Gln Val
 165 170 175
 Asp Val Thr Ser Phe Ala Gly His Pro Cys Thr Arg Ala Ser Gly His
 180 185 190
 Pro Cys Leu Asn Gly Ala Ser Cys Val Pro Arg Glu Ala Ala Tyr Val
 195 200 205
 Cys Leu Cys Pro Gly Gly Phe Ser Gly Pro His Cys Glu Lys Gly Leu
 210 215 220
 Val Glu Ala Ser Ala Gly Asp Val Asp Thr Leu Ala Phe Asp Gly Arg
 225 230 235 240
 Thr Phe Val Glu Tyr Leu Asn Ala Val Thr Glu Ser Glu Lys Ala Leu
 245 250 255
 Gln Ser Asn His Phe Glu Leu Ser Leu Arg Thr Glu Ala Thr Gln Gly
 260 265 270
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Lys Ala Thr Glu Arg Ala Asp Tyr Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Ile Val Asp Gly His Leu Gln Leu Ser Tyr Asn Leu Gly Ser
 290 295 300
 Gln Pro Val Val Leu Arg Ser Thr Val Pro Val Asn Thr Asn Arg Trp
 305 310 315 320
 Leu Arg Val Val Ala His Arg Glu Gln Arg Glu Gly Ser Leu Gln Val
 325 330 335
 Gly Asn Glu Ala Pro Val Thr Gly Ser Ser Pro Leu Gly Ala Thr Gln
 340 345 350
 Leu Asp Thr Asp Gly Ala Leu Trp Leu Gly Gly Leu Pro Glu Leu Pro
 355 360 365
 Val Gly Pro Ala Leu Pro Lys Ala Tyr Gly Thr Gly Phe Val Gly Cys
 370 375 380
 Leu Arg Asp Val Val Val Gly Arg His Pro Leu His Leu Leu Glu Asp
 385 390 395 400
 Ala Val Thr Lys Pro Glu Leu Arg Pro Cys Pro Thr Pro
 405 410

<210> 14
 <211> 421
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de agrina resistente a la neurotripsina C44 y4z8 (m)
 10 <400> 14

Leu Ala Asp Phe Asn Gly Phe Ser Tyr Leu Glu Leu Lys Gly Leu His
 1 5 10 15

ES 2 743 239 T3

Thr Phe Glu Arg Asp Leu Gly Glu Lys Met Ala Leu Glu Met Val Phe
 20 25 30
 Leu Ala Arg Gly Pro Ser Gly Leu Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Thr
 35 40 45
 Asp Gly Lys Gly Asp Phe Val Ser Leu Ala Leu His Asn Arg His Leu
 50 55 60
 Glu Phe Arg Tyr Asp Leu Gly Lys Gly Ala Ala Ile Ile Arg Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Pro Ile Ala Leu Gly Thr Trp Val Arg Val Phe Leu Glu Arg Asn
 85 90 95
 Gly Arg Lys Gly Ala Leu Gln Val Gly Asp Gly Pro Arg Val Leu Gly
 100 105 110
 Glu Ser Pro Lys Ser Arg Lys Val Pro His Thr Met Leu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Glu Pro Leu Tyr Val Gly Gly Ala Pro Asp Phe Ser Lys Leu Ala Arg
 130 135 140
 Gly Ala Ala Val Ala Ser Gly Phe Asp Gly Ala Ile Gln Leu Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Gly His Gln Leu Leu Thr Gln Glu His Val Leu Arg Ala Val
 165 170 175
 Asp Val Ala Pro Phe Ala Gly His Pro Cys Thr Gln Ala Val Asp Asn
 180 185 190
 Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Ile Pro Arg Glu Ala Thr Tyr Glu
 195 200 205
 Cys Leu Cys Pro Gly Gly Phe Ser Gly Leu His Cys Glu Lys Gly Ile
 210 215 220
 Val Glu Ala Ser Val Gly Asp Leu Glu Thr Leu Ala Phe Asp Gly Arg
 225 230 235 240
 Thr Tyr Ile Glu Tyr Leu Asn Ala Val Thr Glu Ser Glu Leu Thr Asn
 245 250 255
 Glu Ile Pro Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ser Asn His Phe Glu Leu Ser
 260 265 270
 Leu Arg Thr Glu Ala Thr Gln Gly Leu Val Leu Trp Ile Gly Lys Val
 275 280 285
 Gly Glu Arg Ala Asp Tyr Met Ala Leu Ala Ile Val Asp Gly His Leu
 290 295 300
 Gln Leu Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gln Pro Val Val Leu Arg Ser Thr
 305 310 315 320
 Val Lys Val Asn Thr Asn Arg Trp Leu Arg Val Arg Ala His Arg Glu
 325 330 335
 His Arg Glu Gly Ser Leu Gln Val Gly Asn Glu Ala Pro Val Thr Gly
 340 345 350
 Ser Ser Pro Leu Gly Ala Thr Gln Leu Asp Thr Asp Gly Ala Leu Trp
 355 360 365

ES 2 743 239 T3

Leu Gly Gly Leu Gln Lys Leu Pro Val Gly Gln Ala Leu Pro Lys Ala
370 375 380
Tyr Gly Thr Gly Phe Val Gly Cys Leu Arg Asp Val val val Gly His
385 390 395 400
Arg Gln Leu His Leu Leu Glu Asp Ala Val Thr Lys Pro Glu Leu Arg
405 410 415
Pro Cys Pro Thr Leu
420

REIVINDICACIONES

1. Fragmento C-terminal de agrina modificado con actividad de agrupamiento de RAC, que comprende al menos los dominios LG2 y LG3 de la agrina humana o de ratón en forma entrelazada covalentemente y modificados de manera que la neurotripsina es incapaz de escindir el fragmento para su uso en el tratamiento de enfermedades neuromusculares o enfermedades de nervios, músculos y uniones neuromusculares, en el que el fragmento de agrina modificado está **caracterizado porque** su sitio de β -escisión se ha suprimido o modificado de manera que la neurotripsina es incapaz de escindirlo.
- 5
- 10 2. Fragmento de agrina modificado para su uso según la reivindicación 1, en el que el fragmento es un fragmento C-terminal de agrina consistente en los dominios LG2, EG4 y LG3 de agrina y alberga el sitio de β -escisión inactivado de la neurotripsina.
3. Fragmento de agrina modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el residuo de lisina P1 (K1859) ha mutado en alanina.
- 15
4. Fragmento de agrina modificado para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** comprende la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:3 o variantes de la misma que no comprende ninguna inserción en el sitio y, y/o ninguna inserción en el sitio z, o una inserción de 11 aminoácidos de SEQ ID NO:9 en el sitio z o una inserción de 19 aminoácidos de SEQ ID NO:10, en el sitio z.
- 20
5. Fragmento de agrina modificado para su uso según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la neurotripsina, especialmente enfermedades con niveles elevados de neurotripsina.
- 25 6. Fragmento de agrina modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** las enfermedades neuromusculares o enfermedades de los nervios, músculos y uniones neuromusculares incluyen sarcopenia, debilidad muscular, fragilidad, atrofia muscular y distrofia muscular, miastenia, miotonía, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.
- 30 7. Fragmento de agrina modificado para su uso según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la atrofia muscular por inactividad o el síndrome de consunción corporal.
8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la sarcopenia y enfermedades musculares que comprende un fragmento de agrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35

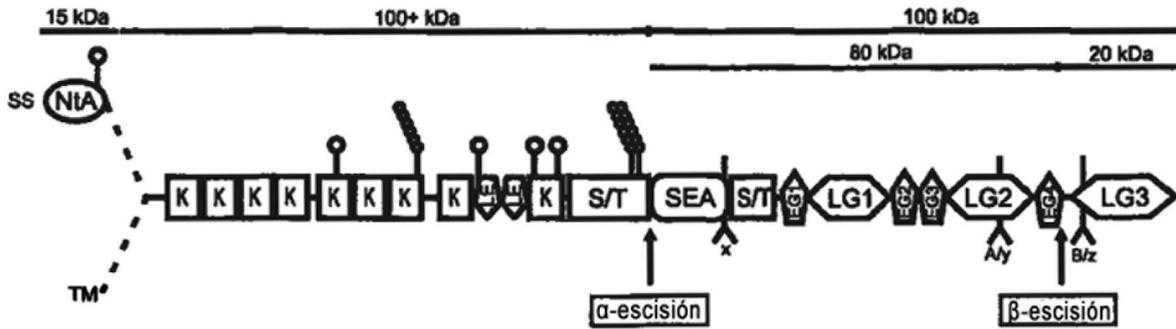


Fig 1

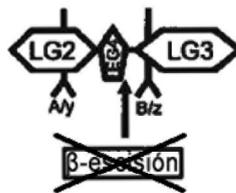


Fig 2a

LADFNGFSHL	ELRGLHTFAR	DLGEKMALEV	VFLARGPSGL	LLYNGQKTDG	KGDFVSLALR	60
DRRLEFRYDL	GKGAAVIRSR	EPVTLGAWTR	VSLEENGRKG	ALRVGDGPRV	LGESPKSRKV	120
PHTVLNLKEP	LYVGGAPDFS	KLARAAVSS	GFDGAIQLVS	LGGRQLLTPE	HVLRQVDVTS	180
FAGHPCTRAS	GHPCLNGASC	VPREAAVYCL	CPGGFSGPHC	EKGLVEASAG	DVDTLAFDGR	240
TFVEYLNAV	ESELANEIPV	EKALQSNHFE	LSLRTEATQG	LVLWSGKATE	RADYVALAIV	300
DGHLQLSYNL	GSQPVVLRS	VPVNTNRWLR	VVAHREQREG	SLQVGNEAPV	TGSSPLGATQ	360
LDTDGALWLG	GLPELPVPGA	LPKAYGTGFV	GCLRVDVVGR	HPLHLLEDAV	TKPELRPCPT	420
P						421

Fig 2b

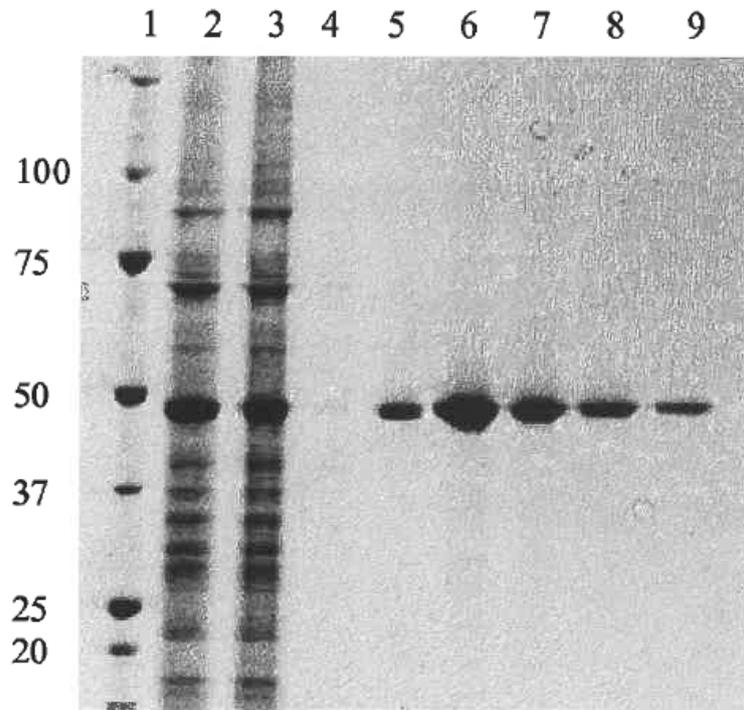


Fig 3

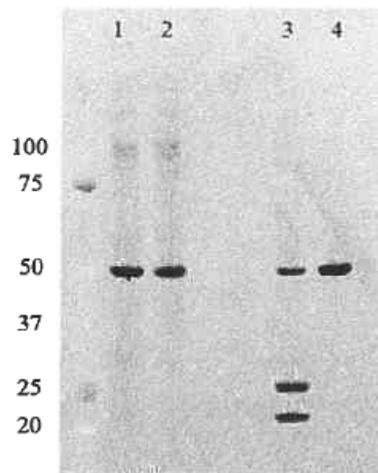


Fig 4

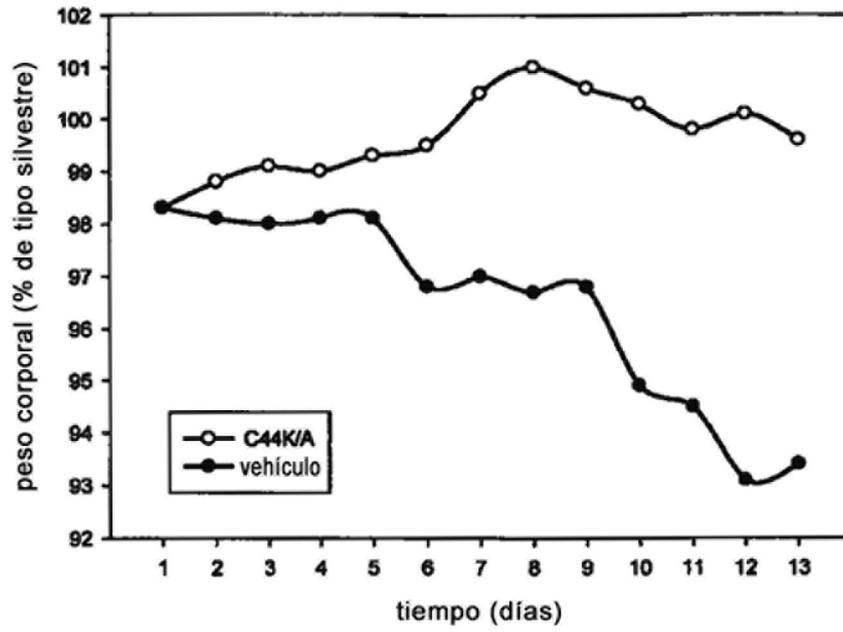


Fig 5

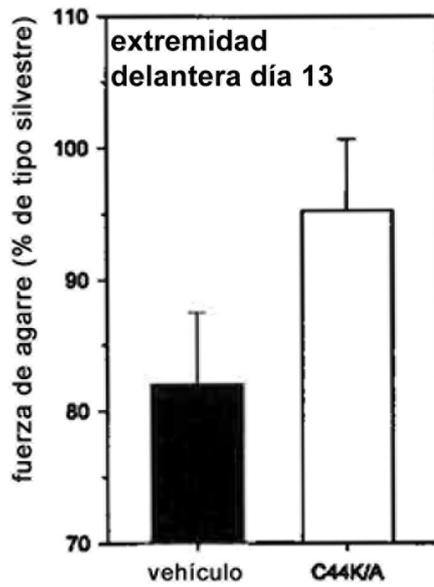


Fig 6a

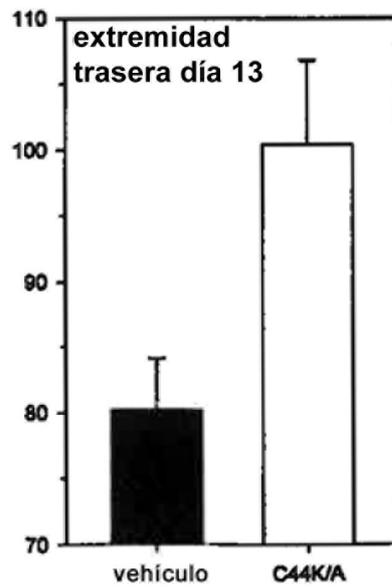


Fig 6b

LADFNGFSHL	ELRGLHTFAR	DLGEKMALEV	VFLARGPSGL	LLYNGQKTDG	KGDFVSLALR	60
DRRLEFRYDL	GKGAAVIRSR	EPVTLGAWTR	VSLERNRKG	ALRVGDGPRV	LGESVPVHTV	120
LNLKEPLYVG	GAPDFSKLAR	AAAVSSGFDG	AIQLVSLGGR	QLLTPEHVLR	QVDVTSFAGH	180
PCTRASGHPC	LNGASCVPRE	AAVCLCPGG	FSGPHCEKGL	VEASAGDVDT	LAFDGRTFVE	240
YLNAVTESEL	ANEIPVEKAL	QSNHFELSLR	TEATQGLVLW	SGKATERADY	VALAIVDGHL	300
QLSYNLGSQP	VVLRSTVPVN	TNRWLRVVAH	REQREGSLQV	GNEAPVTGSS	PLGATQLDTD	360
GALWLGGLEPE	LPVGPALPKA	YGTGFVGCLE	DVVVGRHPLH	LLEDAVTKPE	LRPCPTP	417

Fig. 7

LADFNGFSYL	ELKGLHTFER	DLGEKMALEM	VFLARGPSGL	LLYNGQKTDG	KGDFVSLALH	60
NRHLEFRYDL	GKGAAIIRSK	EPIALGTWVR	VFLERNRKG	ALQVGDGPRV	LGESVPVHTM	120
LNLKEPLYVG	GAPDFSKLAR	GAVASGFDG	AIQLVSLRGH	QLLTQEHLR	AVDVAPFAGH	180
PCTQAVDNPC	LNGGSCIPRE	ATYECLCPGG	FSGLHCEKGI	VEASVGDLET	LAFDGRTYIE	240
YLNAVTESEL	TNEIPA EKAL	QSNHFELSLR	TEATQGLVLW	IGKVERADY	MALAIVDGHL	300
QLSYDLGSQP	VVLRSTVKVN	TNRWLRVRAH	REHREGSLQV	GNEAPVTGSS	PLGATQLDTD	360
GALWLGGLOK	LPVGPALPKA	YGTGFVGCLE	DVVVGRHQLH	LLEDAVTKPE	LRPCPTL	417

Fig. 8

LADFNGFSHL	ELRGLHTFAR	DLGEKMALEV	VFLARGPSGL	LLYNGQKTDG	KGDFVSLALR	60
DRRLEFRYDL	GKGAAVIRSR	EPVTLGAWTR	VSLERNRKG	ALRVGDGPRV	LGESPKSRKV	120
PHTVLNLKEP	LYVGGAPDFS	KLARAAVSS	GFDGAIQLVS	LGGRQLLTPE	HVLRQVDVTS	180
FAGHPCTRAS	GHPCLNGASC	VPREAAVYCL	CPGGFSGPHC	EKGLVEASAG	DVDTLAFDGR	240
TFVEYLNAV	ESEKALQSNH	FELSLRTEAT	QGLVLWSGKA	TERADYVALA	IVDGHLQLSY	300
NLGSQPVVLR	STVPVNTNRW	LRVVAHREQR	EGSLQVGN EA	PVTGSSPLGA	TQLDTDGALW	360
LGGLPELVPV	PALPKAYGTG	FVGCLEDRVV	GRHPLHLED	AVTKPELRPC	PTP	413

Fig. 9

LADFNGFSYL	ELKGLHTFER	DLGEKMALEM	VFLARGPSGL	LLYNGQKTDG	KGDFVSLALH	60
NRHLEFRYDL	GKGAAIIRSK	EPIALGTWVR	VFLERNRKG	ALQVGDGPRV	LGESPKSRKV	120
PHTMLNLKEP	LYVGGAPDFS	KLARGA AVAS	GFDGAIQLVS	LRGHQLLTQE	HVLRADVAP	180
FAGHPCTQAV	DNPCLNGGSC	IPREATYECL	CPGGFSGLHC	EKGIVEASVG	DLETLAFDGR	240
TYIEYLNAV	ESELTNEIPA	EKALQSNHFE	LSLRTEATQG	LVLWIGKVGE	RADYMALAIV	300
DGHLQLSYDL	GSQPVVLRST	VKVNTNRWLR	VRAHREHREG	SLQVGN EAPV	TGSSPLGATQ	360
LDTDGALWLG	GLQKLPVQA	LPKAYGTGFV	GCLDRVVVGH	RQLHLEDAV	TKPELRPCPT	420
L						421

Fig. 10

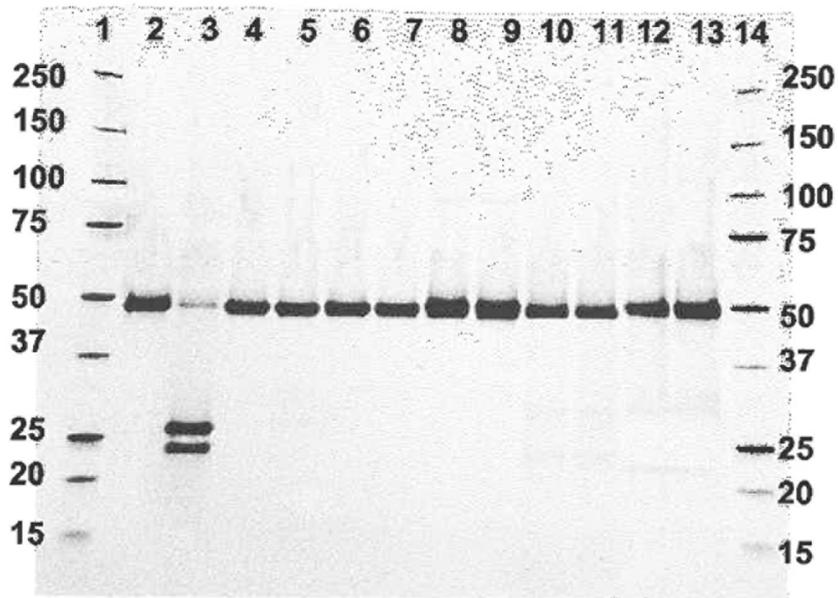


Fig. 11

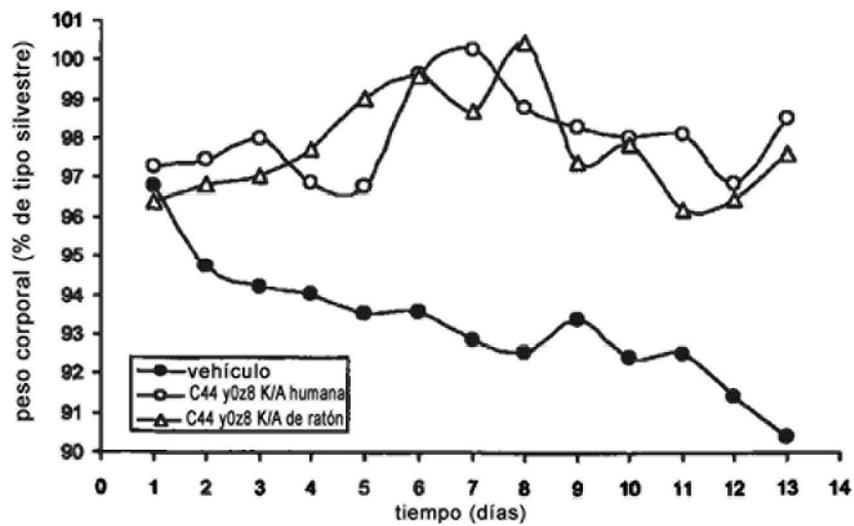


Fig. 12

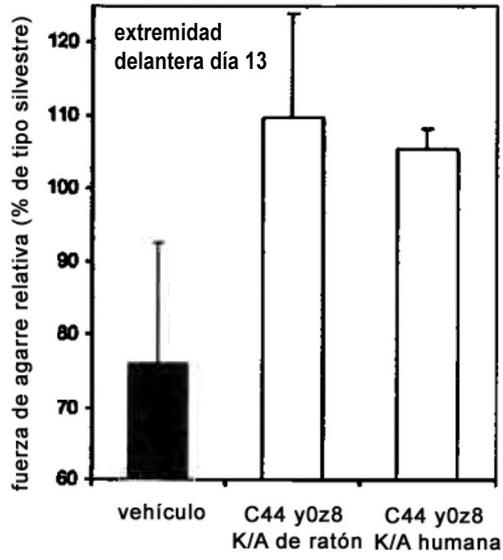


Fig. 13a

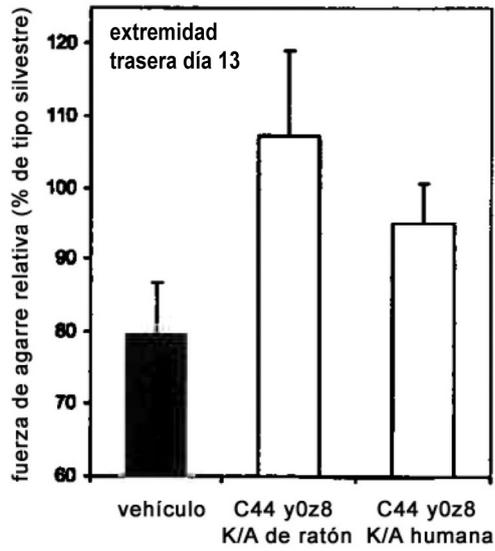


Fig. 13b