

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 581**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/71** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06827481 .0**
- 96 Fecha de presentación: **01.11.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1943273**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Receptor de activina novedoso y usos del mismo**

30 Prioridad:  
**01.11.2005 US 732270 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.07.2012**

73 Titular/es:  
**AMGEN INC.  
LAW DEPARTMENT ONE AMGEN CENTER  
DRIVE  
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:  
**HAN, HQ;  
KWAK, Keith Soo-Nyung y  
ZHOU, Xiaolan**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 385 581 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

Receptor de activina novedoso y usos del mismo

5 **Campo técnico de la invención**

El campo técnico de la presente invención se refiere a miembros de la familia del factor  $\beta$  del crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) y receptores de TGF- $\beta$ , así como también a métodos para modular las actividades de los miembros de la familia de TGF- $\beta$  para el tratamiento de diversos trastornos.

10

**Antecedentes de la invención**

La familia de proteínas del factor  $\beta$  del crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) incluye los factores  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), activinas, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores del crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico obtenido del cerebro (BDNF) y factores de crecimiento/diferenciación (GDF). Estos miembros de la familia están implicados en la regulación de una amplia diversidad de procesos biológicos incluyendo proliferación y diferenciación celular y otras funciones. Las activinas se descubrieron originalmente como péptidos gonadales implicados en la regulación de la síntesis de la hormona folículo estimulante y ahora se cree que están implicadas en la regulación de varias actividades biológicas incluyendo el control de sección y expresión de hormonas de la pituitaria anterior tales como FSH, GH y ACTH, supervivencia de neuronas, secreción de oxitocina hipotalámica, eritropoyesis, esteroidogénesis placentaria y gonadal, desarrollo embrionario temprano y proliferación de algunos tipos de tumores. Las activinas A, B y AB son los homodímeros y heterodímeros respectivamente de dos cadenas polipeptídicas,  $\beta$ A y  $\beta$ B (Vale *et al.* Nature 321, 776-779 (1986), Ling *et al.*, Nature 321, 779-782 (1986)). Las dos cadenas  $\beta$  también se pueden dimerizar con una cadena relacionada dando origen a las inhibinas A y B respectivamente (Mason *et al.*, Nature 318, 659-663 (1986)). Se ha establecido bien que las inhibinas son necesarias para mantener la función normal en muchos tejidos, particularmente aquellos asociados con funciones reproductoras. En estos tejidos las inhibinas se oponen a muchas, pero no a todas, las actividades de activina.

15

20

25

30

El factor de crecimiento/diferenciación 8 (GDF-8), también denominado miostatina, es un miembro de la familia de TGF- $\beta$  expresado en su mayoría en las células de tejido muscular esquelético en desarrollo y adulto. La miostatina parece jugar un papel esencial (McPherron *et al.* Nature (Londres) 387, 83-90 (1997)). Las miostatinas antagonizantes han demostrado aumentar la masa muscular magra en animales (McPherron *et al.*, mencionado anteriormente, Zimmers *et al.*, Science 296: 1486 (2002)).

35

Otro miembro de la familia de proteínas de TGF- $\beta$  es un factor del crecimiento/diferenciación relacionado, GDF-11. GDF-11 tiene una identidad de aproximadamente el 90% de la secuencia de aminoácidos de miostatina. GDF-11 tiene un papel en la formación de patrón axial en animales en desarrollo (Oh *et al.*, Genes Dev 11: 1812-26 (1997)) y también parece jugar un papel en el desarrollo y crecimiento del músculo esquelético. Sin embargo, el papel posnatal de GDF-11 no se comprende actualmente.

40

Una familia de serina/treonina quinasas transmembrana se conoce que actúa como receptores de activinas y otros miembros de la familia de TGF- $\beta$ . Estos receptores caen en dos subfamilias diferentes conocidas como receptores de tipo I y tipo II que actúan cooperativamente para unir ligando y transducir señal (Attisano *et al.*, Mol Cell Biol 16 (3), 1066-1073 (1996)). La mayoría de los ligandos de TGF- $\beta$  se cree que se unen en primer lugar a un receptor de tipo II y este complejo de ligando/receptor de tipo II después recluta un receptor de tipo I (Mathews, LS, Endocr Rev 15:310-325 (1994); Massague, Nature Rev: Mol Cell Biol. 1, 169-178 (2000)). La quinasa receptora de tipo II después fosforila y activa a la quinasa receptora de tipo I, la cual a su vez fosforila las proteínas Smad. Las activinas inicialmente se unen a sus receptores de tipo II ActRIIA para activina A o ActRIIB para activina B. Esto está seguido por el reclutamiento, la fosforilación y la posterior activación del receptor de tipo I, quinasa 4 similar a activina (ALK4). A la activación, la ALK4 se une y después fosforila un subgrupo de proteínas Smad citoplasmáticas (Smad2 y Smad3) que producen la transducción de señal para activinas (Derynck, R *et al.* Cell 95, 737-740 (1998)).

45

50

Estudios de entrecruzamiento han determinado que la miostatina es capaz de unirse a los receptores de tipo II de activina ActRIIA y ActRIIB *in vitro* (Lee *et al.* PNAS EE.UU. 98: 9306-11 (2001)). También existe evidencia de que GDF-11 se une tanto a ActRIIA como ActRIIB (Oh *et al.*, Genes Dev 16: 2749-54 (2002)).

55

Las proteínas de TGF- $\beta$  se conoce que están asociadas con una diversidad de patologías y la antagonización de estas proteínas puede ser útil como un tratamiento terapéutico para las patologías. En particular la antagonización de varias proteínas de TGF- $\beta$  simultáneamente puede ser particularmente eficaz para tratar determinadas enfermedades. La presente invención proporciona una composición novedosa de materia y métodos de uso de la composición de materia como un tratamiento para trastornos relacionados con músculo y otros trastornos.

60

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una proteína que comprende polipéptidos de receptor IIB5 de activina humana

65

(denominado ActRIIB5) como se expone en la reivindicación 5. En una realización, la proteína comprende polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2. En otra realización la proteína comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos aproximadamente el 80% o mayor con SEC ID N°: 2, en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A, o GDF-11. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos aproximadamente el 80% o mayor con SEC ID N°: 2, en el que el extremo C del polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización la proteína comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos aproximadamente el 80% o más con SEC ID N°: 2, en el que el extremo C del polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de aproximadamente al menos el 80% o más con SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En una realización, el polipéptido carece de una secuencia señal de ActRIIB5. En otra realización, la proteína comprende un polipéptido codificado por el polinucleótido que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1.

En otra realización, la proteína de la presente invención comprende polipéptidos de ActRIIB5 fusionados a uno o más polipéptidos heterólogos. En una realización, los polipéptidos de ActRIIB5 fusionados carecen de una secuencia señal. En una realización los polipéptidos de ActRIIB5 están fusionados a los polipéptidos heterólogos a través de una o más secuencias enlazadoras. En otra realización los polipéptidos heterólogos comprenden un dominio Fc. En otra realización, el dominio Fc está conectado a los polipéptidos de ActRIIB5 por al menos una secuencia enlazadora. En otra realización los polipéptidos de ActRIIB5 están unidos a una molécula transportadora no proteica tal como una molécula de PEG.

En otro aspecto la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de ActRIIB5 como se expone en las reivindicaciones. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID N°: 1 o su complemento. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2 o su complemento. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende (c) un polinucleótido que se hibrida a (a) o (b) en condiciones de al menos rigurosidad moderada en formamida a aproximadamente el 50%, SSC 6X a aproximadamente 42°C y condiciones de lavado de aproximadamente 60°C, SSC 0,5X, SDS al 0,1% y en el que el polipéptido codificado comprende un extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende el polinucleótido de (c) en el que el extremo C del polipéptido codificado tiene una secuencia de aminoácidos de una identidad de al menos aproximadamente el 80% o más con SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende el polinucleótido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80% o más con SEC ID N°: 1.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende además polinucleótidos que codifican al menos una proteína heteróloga en fase con los polinucleótidos que codifican un polipéptido de ActRIIB5. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende polinucleótidos que codifican secuencias peptídicas enlazadoras que unen al polipéptido ActRIIB5 a al menos una proteína heteróloga. En otra realización la proteína heteróloga es un polipéptido de Fc. La presente invención proporciona además un vector que comprende las moléculas de ácido nucleico expuestas anteriormente, así como también una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para expresar las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y métodos para producir la proteína de ActRIIB5.

La presente invención proporciona además una composición que contiene la proteína de la presente invención. En una realización, la composición es una composición farmacéutica que contiene la proteína en mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas y composiciones de la invención se pueden usar para inhibir la actividad de las proteínas de TGF- $\beta$  miostatina, activina o GDF-11 *in vitro* y *in vivo* poniendo en contacto las proteínas con un polipéptido de ActRIIB5. Las moléculas y composiciones se pueden usar para aumentar la masa muscular magra y la fuerza y para aumentar la proporción de músculo magro a grasa en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad eficaz de la composición que contiene proteínas de ActRIIB5 al sujeto. En una realización de este método, el sujeto es un animal para alimento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona las composiciones terapéuticas para tratar o prevenir una enfermedad de pérdida de músculo en un sujeto que sufre de un trastorno de este tipo administrando una composición terapéutica que contiene una proteína de ActRIIB5 al sujeto. La enfermedad de pérdida de músculo incluye o se produce como resultado, aunque no se limita a, las siguientes afecciones: distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, caquexia por cáncer, caquexia química, VIH/SIDA, insuficiencia renal, uremia, artritis reumatoide, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia de órganos, síndrome del túnel del carpo, privación de andrógeno y pérdida de músculo debida a inactividad

tal como reposo en cama prolongado, lesión de médula espinal, apoplejía, fractura ósea, envejecimiento. La pérdida de músculo también se puede producir como resultado de acontecimientos tales como ingravidez a partir de vuelo espacial, resistencia a la insulina, pérdida de músculo debido a quemaduras, privación de andrógeno y otros trastornos. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para tratar una enfermedad correlacionada con la expresión de activina A. En una realización, la enfermedad es cáncer. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para tratar un trastorno metabólico que comprende administrar una composición terapéutica a un sujeto que necesita tal tratamiento, en el que el trastorno metabólico se selecciona entre diabetes, obesidad, tolerancia a la glucosa alterada, hiperglucemia, privación de andrógeno, síndrome metabólico y pérdida ósea. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para terapia génica que comprende administrar un vector que codifica las proteínas de ActRIIB5 de la presente invención a un sujeto que lo necesita, en el que el vector es capaz de expresar el polipéptido de ActRIIB5 en el sujeto.

La presente invención además proporciona un método para detectar y cuantificar las proteínas de TGF- $\beta$  miostatina, GDF-11 o activina A poniendo en contacto estas proteínas con un polipéptido de ActRIIB5 y detectando el polipéptido.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de la determinación mediante ensayo Biacore® de CE<sub>50</sub> para ActRIIB5/Fc en comparación con ActRIIB-ECD/Fc.

La Figura 2 muestra el aumento en peso corporal a lo largo del tiempo en ratones C57Bl/6 a los que se ha inyectado AAV-activina A, AAV-promiostatina/Fc, AAV- ActRIIB5/Fc, AAV- ActRIIB-ECD/Fc y control de vector AAV vacío.

La Figura 3 muestra el porcentaje de cambio de peso corporal en comparación con el control siete semanas después de la infección viral en ratones C57Bl/6 a los que se ha inyectado vector de AAV-activina A, AAV-ActRIIB5/Fc, AAV-ActRIIB-ECD/Fc y AAV-promiostatina/Fc.

La Figura 4A muestra una reducción en el peso corporal a lo largo de tiempo para ratones obesos Ay a los que se ha inyectado AAV-ActRIIB5/Fc en comparación con un grupo de control de ratones obesos Ay a los que se ha inyectado vectores vacíos de AAV a lo largo de un periodo de aproximadamente tres meses. La Figura 4B muestra una reducción en la ingesta de alimentos semanal para el mismo grupo de ratones AAV- ActRIIB5 en comparación con el grupo de control a lo largo del mismo periodo de tiempo.

La Figura 5A muestra el cambio en la masa corporal magra a lo largo del tiempo para ratones obesos Ay a los que se ha inyectado AAV-ActRIIB5/Fc en comparación con un grupo de control de ratones obesos Ay a los que se ha inyectado vector vacío de AAV a lo largo de un periodo de aproximadamente tres meses. La Figura 5B muestra una reducción grande de masa grasa para los ratones AAV-ActRIIB5/Fc en comparación con un grupo de control de ratones de AAV vacío a lo largo del mismo periodo de tiempo.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un receptor de activina humana novedoso denominado de receptor de activina IIB5 (ActRIIB5). Este receptor se caracteriza por su capacidad de unirse a tres proteínas de TGF- $\beta$ , miostatina (GDF-8), activina A y GDF-11 y de inhibir las actividades de estas proteínas.

Como se usa en el presente documento la expresión “miembros de la familia de TGF- $\beta$ ” o “proteínas de TGF- $\beta$ ” se refiere a los factores del crecimiento relacionados estructuralmente de la familia del factor del crecimiento transformante incluyendo activinas y proteínas de factor de crecimiento y diferenciación (GDF) (Kinglsey *et al.* Genes Dev. 8: 133-146 (1994), McPherron *et al.* Growth factors and cytokines in health and disease Vol 1 B, D. LeRoith y C. Bondy. ed., JAI Press Inc., Greenwich, Conn, EE.UU.: págs. 357-393). GDF-8, también denominado miostatina, se conoce que es un regulador negativo del tejido de músculo esquelético (McPherron *et al.* PNAS EE.UU. 94: 12457-12461 (1997)). La miostatina se sintetiza como un complejo de preproteína inactiva de aproximadamente 375 aminoácidos de longitud, que tiene el N° de Acceso de GenBank: AAB86694 para seres humanos. La proteína precursora se activa mediante la escisión proteolítica en un sitio de procesamiento tetraabásico para producir un prodominio inactivo N-terminal y una proteína C terminal de aproximadamente 109 aminoácidos que dimeriza para formar un homodímero de aproximadamente 25 kDa. Este homodímero es la proteína madura y biológicamente activa (Zimmers *et al.*, Science 296,1486 (2002)). Como se usa en el presente documento, el término “prodominio” o “propéptido” se refiere a la proteína N terminal inactiva que se escinde para liberar la proteína C terminal activa. Como se usa en el presente documento el término “miostatina” o “miostatina madura” se refiere al polipéptido C terminal maduro y biológicamente activo, en forma de monómero, dímero u otra forma, así como también fragmentos o polipéptidos relacionados biológicamente activos incluyendo variantes alélicas, variantes de corte y empalme y péptidos de fusión y polipéptidos. Se ha informado que la miostatina madura tiene una identidad de secuencia del 100% entre muchas especies incluyendo seres humanos, ratón, pollo, porcinos, pavo y rata (Lee *et al.*, PNAS 98, 9306 (2001)). Como se usa en el presente documento GDF-11 se refiere a la proteína de BMP que tiene el número

de acceso SwissPro 095390, así como también variantes y homólogos de especie de esa proteína. GDF-11 tiene una identidad de aproximadamente el 90% con miostatina a nivel de aminoácido. GDF-11 está implicada en la regulación de la formación de patrón anterior/posterior del esqueleto axial (McPherron *et al.*, *Natr Genet* 22 (93): 260-264 (1999); Gamer *et al.*, *Dev. Biol.* 208 (1), 222-232 (1999)) pero se desconocen las funciones posnatales. La activina A es el homodímero de las cadenas polipeptídicas BA. Como se usa en el presente documento el término "activina A" se refiere a la proteína activina de que tiene el N° de Acceso de GenBank: NM\_002192, así como también variantes y homólogos de especie de esa proteína.

#### Receptores de activina

Como se usa en el presente documento, el término "receptor B de tipo II de activina" (ActRIIB) se refiere al receptor de activina precursor humano que tiene el número de acceso NP\_001097 para proteína o cualquier variante u homólogo de este receptor. Las secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos del precursor de ActRIIB humano se exponen en SEC ID N°: 4 y 5 respectivamente. En SEC ID N°: 6 se expone una variación de ActRIIB, en la que la arginina en la posición 64 se ha reemplazado con alanina. SEC ID N°: 5 se denomina la forma R y SEC ID N°: 6 se denomina la forma A. El dominio extracelular de ActRIIB (ActRIIB-ECD) se representa por los aminoácidos 1 a 124 de SEC ID N°: 5 y 6. Las isoformas murinas adicionales de este receptor se han identificado como muActRIIB1, muActRIIB2, muActRIIB3 y muActRIIB4.

La presente invención proporciona un receptor de activina humano novedoso denominado receptor de activina IIB5 (ActRIIB5). Este receptor se caracteriza por la secuencia C terminal expuesta en SEC ID N°: 3. El ADNc de este receptor se aisló y se ha descrito en el Ejemplo 1 y se observó que faltaban las 152 bases nucleotídicas correspondientes al exón 4. Este receptor se caracteriza además como que carece de la región transmembrana codificada por el exón 4 del ActRIIB. Este receptor se caracteriza además por ser un receptor soluble y secretado en lugar de un receptor unido a membrana. El receptor se caracteriza además por tener la capacidad de unirse e inhibir la actividad de uno cualquiera de activina A, miostatina o GDF-11.

La presente invención proporciona proteínas aisladas que comprenden polipéptidos de receptor de ActRIIB5. Como se usa en el presente documento el término "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico purificada en algún grado a partir de material endógeno. En una realización, la proteína comprende polipéptidos de ActRIIB5 que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2 y variantes y derivados de este polipéptido, que conservan la actividad del polipéptido de SEC ID N°: 2, como se ha indicado. En una realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80%, una identidad de al menos aproximadamente el 85%, identidad de al menos aproximadamente el 90%, identidad de al menos aproximadamente el 95%, identidad de al menos aproximadamente el 98% o identidad de al menos aproximadamente el 97% con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2, en la que el polipéptido conserva la actividad del polipéptido de SEC ID N°: 2. En otra realización, la proteína comprende los polipéptidos de ActRIIB5 descritos anteriormente en el que el polipéptido tiene un extremo C que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido conserva la actividad del polipéptido de SEC ID N°: 2. En otra realización, la proteína comprende los polipéptidos de ActRIIB5 descritos anteriormente en los que el extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99% con SEC ID N°: 3, en el que el polipéptido conserva la actividad del polipéptido de SEC ID N°: 2. En una realización, el polipéptido de ActRIIB5 carece de una secuencia señal de SEC ID N°: 2, por ejemplo, los aminoácidos 1 a 17 de SEC ID N°: 2.

Como se usa en el presente documento el término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos insertados, suprimidos o sustituidos en la secuencia de aminoácidos original, pero que tiene una secuencia que permanece sustancialmente similar a SEC ID N°: 2 y que conserva las actividades de los polipéptidos de ActRIIB5 de SEC ID N°: 2. Como se usa en el presente documento los fragmentos de los polipéptidos que conservan la actividad de los polipéptidos están incluidos en el término "variantes". Para los fines de la presente invención, "sustancialmente similar" es al menos aproximadamente el 80% idéntico a la secuencia de aminoácidos, al menos aproximadamente el 85% idéntico, al menos aproximadamente el 90% idéntico, al menos aproximadamente el 95% idéntico, al menos aproximadamente el 98% idéntico, al menos aproximadamente el 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2 y conserva las actividades biológicas del polipéptido de SEC ID N°: 2. Las sustituciones de aminoácidos que son sustituciones conservativas es poco probable que influyan sobre la actividad biológica y se consideran idénticos para los fines de la presente invención e incluyen las siguientes: Ala por Ser, Val por He, Asp por Glu, Thr por Ser, Ala por Gly, Ala por Thr, Ser por Asn, Ala por Val, Ser por Gly, Tyr por Phe, Ala por Pro, Lys por Arg, Asp por Asn, Leu por He, Leu por Val, Ala por Glu, Asp por Gly y a la inversa. (Véase, por ejemplo, Neurath *et al.*, *The Proteins*, Academic Press, New York (1979)). Se puede encontrar información adicional relacionada con los intercambios de aminoácidos fenotípicamente silentes en Bowie *et al.*, 1999, *Science* 247: 1306-1310. Las sustituciones de aminoácidos también incluyen sustituciones en SEC ID N°: 2 de aminoácidos de origen no natural, D-aminoácidos, aminoácidos alterados o peptidomiméticos. Las sustituciones de aminoácidos también incluyen sustituciones de aminoácidos no conservativas, tales como hidrófobos neutros por polar neutro, ácido por básico y otras clases de sustituciones, siempre y cuando los polipéptidos sustituidos conserven las actividades de los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos en

SEC ID N°: 2. Las variantes incluyen además modificaciones a los extremos C y N que surgen a partir del procesamiento debido a la expresión en diversos tipos celulares tales como células de mamífero, *E. coli*, levaduras y otras células hospedadoras recombinantes. Las variantes incluyen además fragmentos polipeptídicos y polipéptidos que comprenden sitio o sitios de N-glicosilación inactivados, sitio o sitios de procesamiento o proteasa inactivados o sustitución o sustituciones de aminoácidos conservativas, de la secuencia polipeptídica expuesta en SEC ID N°: 2.

La identidad y similitud de péptidos y polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds. Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); y Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los métodos para determinar el grado de relación o el porcentaje de identidad de dos polipéptidos se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programa GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público en el Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul *et al*/NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, mencionados anteriormente (1990)). También se puede usar el algoritmo bien conocido de Smith Waterman para determinar identidad.

Como se usa en el presente documento el término “derivado” de los polipéptidos de ActRIIB5 se refiere a la unión de al menos un resto químico adicional o al menos un polipéptido adicional para formar conjugados covalentes o agregados tales como grupos glicosilo, lípidos, grupos acetilo o proteínas de fusión C terminal o N terminal, conjugación a moléculas de PEG y otras modificaciones que se describen más completamente más adelante.

Como se usa en el presente documento, la expresión una “actividad de polipéptido de ActRIIB5” o “una actividad biológica de polipéptido de ActRIIB5” se refiere a una o más actividades *in vitro* o *in vivo* de los polipéptidos de ActRIIB5 incluyendo pero sin limitación aquellas demostradas en los Ejemplos más adelante. Las actividades de los polipéptidos de ActRIIB5 incluyen, pero sin limitación, la capacidad de unirse a miostatina o activina A o GDF-11, la capacidad de reducir o neutralizar una actividad de miostatina o activina A o GDF-11. Por ejemplo, el ensayo basado en células C2C12 pMARE descrito en el Ejemplo 3 más adelante mide la actividad de neutralización de activina A, la actividad de neutralización de miostatina y la actividad de neutralización de GDP-11. Las actividades *in vivo* incluyen pero sin limitación el aumento del peso corporal, el aumento de la masa muscular magra y la reducción de la masa grasa según se demuestra en modelos animales más adelante. Las actividades biológicas incluyen además la reducción o prevención de caquexia causada por ciertos tipos de tumores y la prevención de metástasis de ciertas células tumorales. Más adelante se proporciona análisis adicional de las actividades del polipéptido de ActRIIB5.

Las proteínas de la presente invención comprenden además proteínas heterólogas unidas al polipéptido de ActRIIB5 directamente o a través de una secuencia enlazadora para formar una proteína de fusión. Como se usa en el presente documento el término “proteína de fusión” se refiere a una proteína que tiene un polipéptido heterólogo unido a través de técnicas de ADN recombinante. Las proteínas heterólogas incluyen pero sin limitación polipéptidos de Fc, etiquetas his y dominios de cremallera de leucina para promover la oligomerización y estabilización de los polipéptidos de ActRIIB5 como se ha descrito en, por ejemplo, el documento WO 00/29581. Como se usa en el presente documento el término “Fc” o “polipéptido de Fc” se refiere a polipéptidos que contienen el dominio Fc de un anticuerpo. El “dominio Fc” se refiere a la parte del anticuerpo que es responsable de la unión a receptores de anticuerpos en las células. Un dominio Fc puede contener uno, dos o todos los siguientes: el dominio pesado constante 1 (C<sub>H1</sub>), el dominio pesado constante 2 (C<sub>H2</sub>), el dominio pesado constante 3 (C<sub>H3</sub>) y la región de bisagra. El dominio Fc de la IgG1 humana, por ejemplo, contiene el dominio C<sub>H2</sub> y el dominio C<sub>H3</sub> y la región de bisagra, pero no el dominio C<sub>H1</sub>. Las formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región de bisagra que promueve la dimerización también están incluidas. Véase, por ejemplo, C. A. Hasemann y J. Donald Capra, Immunoglobins: Structure and Function, in William E. Paul, ed. Un Fc es un Fc completamente humano que se puede originar a partir de cualquiera de las inmunoglobulinas, tales como IgG1 e IgG2. Sin embargo, las moléculas de Fc que son parcialmente humanas o que se originan a partir de especies no humanas también se incluyen en el presente documento. Las moléculas de Fc pueden estar formadas por polipéptidos monoméricos que se pueden enlazar en formas díméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, puentes de disulfuro) y no covalentes. El número de puentes de disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). El término “Fc” como se usa en el presente documento se usa para referirse a las formas monoméricas, díméricas y multiméricas. Como se usa en el presente documento, el término “variante de Fc” se refiere a una forma modificada de una secuencia de Fc nativa. Las variantes de Fc se pueden construir por ejemplo, sustituyendo o suprimiendo restos, insertando restos o truncando partes que contienen el sitio. Los restos insertados o sustituidos también pueden ser aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o D-aminoácidos.

Las proteínas de la presente invención pueden opcionalmente comprender además un grupo “enlazador”. Los

- enlazadores sirven principalmente como un separador entre un polipéptido y una segunda proteína heteróloga u otro tipo de fusión o entre dos o más polipéptidos de ActRIIB5. En una realización, el enlazador está hecho de aminoácidos unidos entre sí mediante enlace peptídico, preferentemente de 1 a 20 aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos se seleccionan entre los 20 originales de origen natural. Uno o más de estos aminoácidos puede estar glicosilado, como se comprende por un experto en la materia. En una realización, el 1 a 20 aminoácidos se seleccionan entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Preferentemente, un enlazador está hecho de una mayoría de aminoácidos que no tienen impedimento estérico, tales como glicina y alanina. Los enlazadores ilustrativos son poliglicina (particularmente (Gly)<sub>5</sub>, (Gly)<sub>8</sub>, poli(Gly-Ala) y polialaninas.
- Los enlazadores de la presente invención también son enlazadores no peptídicos. Por ejemplo, se pueden usar los enlazadores de alquilo tales como -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-C(O)-, en el que s = 2-20. Estos enlazadores de alquilo se pueden sustituir adicionalmente por cualquier grupo de impedimento no estérico tal como alquilo inferior (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH<sub>2</sub>, fenilo, etc.
- Las proteínas de la presente invención también se pueden unir a una molécula no proteica con el fin de conferir propiedades deseadas tales como reducir la degradación y/o aumentar la semivida, reducir la toxicidad, reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la actividad biológica de los polipéptidos de ActRIIB. Las moléculas ilustrativas incluyen pero sin limitación polímeros lineales tales como polietilenglicol (PEG), polilisina, un dextrano; un lípido; un grupo de colesterol (tal como un esteroide); un carbohidrato o una molécula de oligosacárido.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos de ActRIIB5 de la presente invención. Como se usa en el presente documento el término "aislado" se refiere a moléculas de ácido nucleico purificadas hasta algún grado a partir de material endógeno. En una realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende un polinucleótido que codifica SEC ID N°: 2. Debido a la degeneración del código genético, en el que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de la mostrada en la SEC ID N°: 1 y aún codificar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID N°: 2. Tales secuencias de ADN variantes pueden producirse como resultado de mutaciones silentes que se producen durante la producción o pueden ser el producto de mutagénesis deliberada de SEC ID N°: 2. En otra realización la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80% con SEC ID N°: 2, una identidad de al menos aproximadamente el 90% con SEC ID N°: 2, una identidad de al menos aproximadamente el 95% con SEC ID N°: 2, una identidad de al menos aproximadamente el 99% con SEC ID N°: 2.
- El porcentaje de identidad se puede determinar mediante inspección visual y cálculos matemáticos. Como alternativa, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico se puede determinar comparando la información de secuencia usando el programa informático GAP, versión 6.0 descrito por (Devereux *et al.*, Nucl. Acids Res., 12: 387 (1984)) disponible en University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de (Gribkov y Burgess, Nucl. Acids Res., 14: 6745 (1986)), como se describe por (Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979)); (2) una penalización de 3.0 por cada hueco y una penalización de 0.10 adicional por cada símbolo en cada hueco; y (3) no penalización para huecos finales. También se pueden usar otros programas usados por un experto en la materia de comparación de secuencias.
- En otra realización la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende un polinucleótido que tiene la secuencia polinucleotídica expuesta en SEC ID N°: 1 o la cadena complementaria de SEC ID N°: 1. En otra realización, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas o moderadas con las regiones codificantes de polipéptido de SEC ID N°: 1, en el que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos C terminal como se expone en SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido codificado mantiene una actividad de los polipéptidos de ActRIIB5.
- En otra realización, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas o moderadas con las regiones codificantes de polipéptido de SEC ID N°: 1, en el que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos C terminal que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80%, una identidad de al menos aproximadamente el 85%, una identidad de al menos aproximadamente el 90%, una identidad de al menos aproximadamente el 95%, una identidad de al menos aproximadamente el 98%, una identidad de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido codificado tiene al menos una actividad de los polipéptidos de ActRIIB5.
- Como se usa en el presente documento, las condiciones de rigurosidad moderadas se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia en base a, por ejemplo, la longitud del ADN. Las condiciones básicas se exponen por (Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1, págs. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) e incluyen uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa SSC 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de aproximadamente el 50% de formamida, SSC 6X a

aproximadamente 42 °C (u otra solución de hibridación similar, tal como solución de Stark en aproximadamente el 50% de formamida a aproximadamente 42 °C) y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, SSC 0,5 X, SDS al 0,1 %. Las condiciones de rigurosidad elevada también se pueden determinar fácilmente por el experto en la materia en base a, por ejemplo, la longitud del ADN. En general, tales condiciones definidas como "condiciones altamente rigurosas" para hibridación y lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,015 M y formamida al 50% a 42 °C. Otras condiciones incluyen hibridación y lavado a aproximadamente 68 °C, SSC 0,2X, SDS al 0,1%. El experto reconocerá que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado se pueden ajustar según sea necesario de acuerdo con los factores tales como la longitud de la secuencia. Véase Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, Ch. 4 (IRL Press Limited).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ADN en forma tanto de cadena única como de doble cadena, así como también el complemento de ARN del mismo. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ADN amplificado por PCR y combinaciones de los mismos. El ADN genómico se puede aislar mediante técnicas convencionales, tales como mediante el uso del ADNc de SEC ID N°: 1 o un fragmento adecuado del mismo, como una sonda. El ADN genómico que codifica polipéptidos de ActRIIB5 se obtiene a partir de bibliotecas genómicas que están disponibles para varias especies. El ADN sintético está disponible a partir de síntesis química de fragmentos oligonucleotídicos solapantes seguido por ensamblaje de los fragmentos para reconstituir parte o todas las regiones codificantes y secuencias flanqueantes. El ARN se puede obtener a partir de vectores de expresión procariotas que dirigen síntesis de alto nivel de ARNm, tales como vectores que usan promotores T7 y ARN polimerasa. El ADNc se obtiene a partir de bibliotecas preparadas a partir de ARNm aislado a partir de diversos tejidos que expresan ActRIIB5. Las moléculas de ADN de la invención incluyen genes de longitud completa así como también polinucleótidos y fragmentos de los mismos. El gen de longitud completa también puede incluir secuencias que codifican la secuencia señal N terminal.

La invención también proporciona métodos para producir e identificar polinucleótidos de ActRIIB5. El procedimiento bien conocido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede emplear para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica un fragmento de proteína deseado. Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean como cebadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden contener adicionalmente sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción del fragmento de ADN amplificado en un vector de expresión. Las técnicas de PCR se describen en Saiki *et al.*, *Science*, 239: 487 (1988); Wu *et al.*, *Recombinant DNA Methodology*, eds., Academic Press, Inc., San Diego, págs. 189-196 (1989); e Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds., Academic Press, Inc. (1990).

En otro aspecto de la presente invención, también se proporcionan vectores de expresión que contienen las secuencias de ácido nucleico y también se proporcionan las células hospedadoras transformadas con tales vectores y métodos para producir los polipéptidos de ActRIIB5. El término "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector para expresar un polipéptido a partir de una secuencia polinucleotídica. Los vectores para la expresión de los polipéptidos de ActRIIB5 contienen un mínimo de secuencias necesario para la propagación de vector y para la expresión del inserto clonado. Un vector de expresión comprende una unidad transcripcional que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia que codifica polipéptidos de ActRIIB5 para transcribirse en ARNm y traducirse en proteína y (3) secuencias de inicio y terminación de transcripción apropiadas. Estas secuencias pueden incluir además un marcador de selección. Los vectores adecuados para expresión en células hospedadoras están disponibles fácilmente y las moléculas de ácido nucleico se insertan en los vectores usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Tales vectores pueden incluir promotores que funcionan en tejidos específicos y vectores virales para la expresión de ActRIIB5 en células humanas o animales dirigidas. Algunos vectores de expresión ilustrativos adecuados para expresión de ActRIIB5 incluyen, pero sin limitación, pDSRa, (descrito en el documento WO 90/14363, incorporado en el presente documento por referencia) y sus derivados, que contienen polinucleótidos de ActRIIB5 y vectores pDC323 o pDC324 (descritos en Bianchi *et al.*, *Biotech and Bioengineering*, Vol 84(4): 439-444 (2003)) que contienen polinucleótidos de ActRIIB5, así como también vectores adecuados adicionales conocidos en la técnica descritos más adelante, se proporcionan por la presente invención.

La solicitud proporciona además métodos para preparar polipéptidos y proteínas de ActRIIB5. Se puede utilizar una diversidad de otros sistemas de expresión/hospedador. Estos sistemas incluyen pero sin limitación microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófago, plásmido o cósmido; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico del coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Las células de mamífero útiles en producciones de proteína recombinante incluyen pero sin limitación células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de hámster Chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Se pueden preferir células hospedadoras de mamífero cuando las modificaciones postraduccionales tales como glicosilación y procesamiento de polipéptidos



son importantes para la actividad. La expresión de mamíferos permite la producción de polipéptidos secretados o solubles que se pueden recuperar a partir del medio de cultivo.

Mediante el uso de un sistema de hospedador-vector apropiado, las proteínas y polipéptidos de ActRIIB5 se producen de forma recombinante cultivando una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene las moléculas de ácido nucleico de la presente invención en condiciones que permiten la producción. Las células transformadas se pueden usar para producción de proteína a largo plazo de alto rendimiento. Una vez que tales células se transforman con vectores que contienen marcadores seleccionables así como también el casete de expresión deseado, se puede permitir que las células se cultiven durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que las mismas se cambien a medio selectivo. El marcador seleccionable se diseña para permitir el crecimiento y la recuperación de células que expresan de forma satisfactoria las secuencias introducidas. Los grupos resistentes de células transformadas de forma estable se pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para la línea celular empleada. Una visión de conjunto de la expresión de proteínas recombinantes se encuentra en *Methods of Enzymology*, v. 185, Goeddel, D. V., ed., Academic Press (1990).

En algunos casos, tal como en la expresión usando sistemas procariotas, los polipéptidos expresados de la presente invención pueden necesitar "replegarse" y oxidarse en una estructura terciaria apropiada y generarse enlaces de disulfuro con el fin de ser biológicamente activos. El replegamiento se puede conseguir usando varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la exposición del polipéptido solubilizado a un pH habitualmente de 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección de caótropo es similar a las elecciones usadas para solubilización de cuerpos de inclusión, sin embargo un caótropo se usa típicamente a una concentración más baja. Los agentes caotrópicos ilustrativos son guanidina y urea. En la mayoría de los casos, la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox particular que permite que ocurra la redistribución de disulfuro para la formación de los puentes de cisteína. Algunas parejas redox usadas comúnmente incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitól DTT/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos casos, se puede usar un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los codisolventes usados comúnmente incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

Las proteínas y polipéptidos de la presente invención se pueden sintetizar en solución o en soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Diversos sintetizadores automáticos están disponibles en el mercado y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young (mencionado anteriormente); Tam *et al.*, *J Am Chem Soc*, 105: 6442, (1983); Merrifield, *Science* 232:341-347 (1986); Barany y Merrifield, *The Peptides*, Gross y Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany *et al.*, *Int J Pep Protein Res*, 30: 705.

Es necesario purificar las proteínas y polipéptidos de la presente invención. Las técnicas de purificación de proteínas se conocen bien por los expertos en la materia. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento crudo de las fracciones proteináceas y no proteináceas. Habiendo separado los polipéptidos peptídicos de otras proteínas, el péptido o polipéptido de interés se puede purificar adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de polipéptidos de la presente invención son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel de poliacrilamida; isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz para purificar péptidos es cromatografía líquida de proteína rápida o incluso HPLC. El término "polipéptido aislado" o "polipéptido purificado" como se usa en el presente documento, tiene por objeto referirse a una composición, aislable a partir de otros componentes, en el que el polipéptido se purifica hasta cualquier grado con relación a su estado obtenible de forma natural. Por lo tanto, un polipéptido purificado también se refiere a un polipéptido que está libre del entorno en el cual el mismo se puede encontrar de forma natural. En general, "purificado" se referirá a una composición de polipéptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar diversos componentes diferentes y cuya composición conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término "sustancialmente purificado", esta designación se referirá a una composición peptídica o polipeptídica en la cual el polipéptido o péptido forma el componente principal de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de las proteínas en la composición.

Diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de polipéptido se conocerán por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinación de la actividad de unión específica de una fracción activa o evaluación de la cantidad de péptido o polipéptido dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción de polipéptido es calcular la actividad de unión de la fracción, compararla con la actividad de unión en el extracto inicial y de ese modo calcular el grado de purificación, evaluado en el presente documento mediante un "número de veces de purificación". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y si el polipéptido o péptido muestra o no una actividad de unión detectable.

Los expertos en la materia conocerán diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación. Éstas incluyen,

por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o mediante desnaturalización por calor, seguido por centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de afinidad (por ejemplo, Proteína-A-Sepharose), intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxapatita y cromatografía de afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de estas técnicas. Como se conoce en general en la técnica, se cree que el orden de conducción de las diversas etapas de purificación se puede cambiar o que determinadas etapas se pueden omitir y aún así dar como resultado un método adecuado para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado.

#### Anticuerpos

La presente invención incluye además anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos receptores de ActRIIB5 de la presente invención. Como se usa en el presente documento la expresión "se une específicamente" se refiere a anticuerpos que tienen una afinidad de unión ( $K_a$ ) por polipéptidos de ActRIIB5 de  $10^6 M^{-1}$  o mayor. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos que incluyen anticuerpos policlonales (véase, por ejemplo *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds), Cold Spring Harbor Press, (1988)) y anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993 y *Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis*, Plenum Press, Kennett, McKearn y Bechtol (eds.) (1980)). Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" también se refiere a un fragmento de un anticuerpo tal como F(ab), F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc y anticuerpos de cadena única que se producen mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. El término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos biespecíficos o bifuncionales, que son un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una diversidad de métodos incluyendo fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. (Véase, *Songsivilai et al*, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990), *Kostelny et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)). Como se usa en el presente documento el término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen un dominio de inmunoglobulina de anticuerpo constante humano acoplado a uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpo variable no humano o fragmentos de los mismos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.595.898 y 5.693.493). Los anticuerpos también se refieren a anticuerpos "humanizados" (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.595.898 y documento WO 5.693.493), minicuerpos (documento WO 94/09817), maxicuerpos y anticuerpos producidos mediante animales transgénicos, en los cuales un animal transgénico que contiene una parte del anticuerpo humano que produce genes pero que carece de la producción de anticuerpos endógenos son capaces de producir anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, *Mendez et al.*, *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997) y Patente de Estados Unidos N° 6.300.129). El término "anticuerpos" también incluye anticuerpos multiméricos o un complejo de proteínas de orden mayor tal como anticuerpos heterodiméricos y anticuerpos anti-idiotípicos. "Anticuerpos" también incluye anticuerpos anti-idiotípicos. Los anticuerpos frente a ActRIIB5 también se pueden usar, por ejemplo, para identificar y cuantificar ActRIIB5 *in vitro* e *in vivo*.

#### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos y proteínas de ActRIIB5 de la presente invención también se proporcionan. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del polipéptido en mezcla con materiales farmacéuticamente aceptables y materiales de formulación fisiológicamente aceptables. La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA)); agentes de formación de complejo (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; saporíferos y diluyentes; agentes emulsificantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de peso molecular bajo; contraiones de formación de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos (preferentemente cloruro de sodio o de potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

La composición farmacéutica óptima se determinará mediante un experto en la materia dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de administración y la dosis deseada. Véase por ejemplo,

Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente. Tales composiciones pueden influir sobre el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* del polipéptido. Por ejemplo, las composiciones adecuadas pueden ser agua para inyección, solución salina fisiológica para administración parenteral.

5 El vehículo o transportador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o transportador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cerebroespinal artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos ilustrativos adicionales. Otras composiciones farmacéuticas ilustrativas comprenden tampón Tris de 10 aproximadamente pH 7,0-8,5 o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado para lo mismo. En una realización de la presente invención, las composiciones se pueden preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, la composición terapéutica se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las formulaciones se pueden administrar en una diversidad de métodos, por ejemplo, mediante terapias de inhalación, por vía oral o mediante inyección. Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones 20 terapéuticas para su uso en la presente invención pueden estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógenos que comprende el polipéptido deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la cual un polipéptido se formula como una solución isotónica estéril, conservada de forma apropiada. Otra preparación más puede incluir la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, 25 compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporcionan la liberación controlada o sostenida del producto que después se puede administrar a través de una inyección de liberación prolongada. También se puede usar ácido hialurónico y éste puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármaco implantables.

30 En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración inyectable se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes lipófilos adecuados o vehículos incluyen aceites grasos, tales como 35 aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. También se pueden usar polímeros amino policatiónicos no lipídicos para administración. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. En otra realización, una composición farmacéutica se puede formular para inhalación. Las soluciones de inhalación también se pueden formular con un propulsor para administración por aerosol. En otra realización adicional, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT N° PCT/US94/001875, que describe 40 administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

45 También se contempla que determinadas formulaciones se pueden administrar por vía oral. En una realización de la presente invención, las moléculas que se administran de esta manera se pueden formular con o sin esos transportadores usados de forma habitual en la preparación de compuestos de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, se puede diseñar una cápsula para liberar la parte activa de la 50 formulación en el punto en el tracto gastrointestinal en el que la biodisponibilidad está maximizada y la degradación presistémica está minimizada. Los agentes adicionales se pueden incluir para facilitar la absorción de la molécula terapéutica. También se pueden emplear diluyentes, saporíferos, ceras de punto de fusión bajo, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimido y aglutinantes. Las composiciones farmacéuticas para administración oral también se pueden formular usando transportadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración oral. Tales transportadores 55 posibilitan que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión por el paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener a través de la combinación de compuestos 60 activos con excipientes sólidos y procesando la mezcla resultante de gránulos (opcionalmente, después de molienda) para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Se pueden añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea. Los excipientes adecuados incluyen cargas de carbohidrato o proteína, tales como azúcares, incluyendo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol, almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, tal como metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa o carboxi metil celulosa de sodio; gomas, incluyendo goma arábica y goma de 65 tragacanto; y proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal de los mismos, tal como

alginato de sodio. Los núcleos de grageas se pueden usar junto con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificación de producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosis.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral también incluyen cápsulas enchufables hechas de gelatina, así como también cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como bisfenol o sorbitol. Las cápsulas enchufables pueden contener ingredientes activos mezclados con cargas o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo formulaciones que incluyen polipéptidos en formulaciones de administración sostenida o controlada. Las técnicas para formular una diversidad de medios de administración sostenida o controlada diferentes, tales como transportadores de liposoma, micropartículas bio-erosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación prolongada, también se conocen por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, el documento PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (documentos U.S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1983), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langeretal., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277, (1981); Langer *et al.*, *Chem. Tech.*, 12: 98-105(1982)), acetato de vinilo de etileno (Langer *et al.*, mencionado anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein *et al.*, *PNAS (EE.UU.)*, documento 82:3688 (1985); documentos EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

La composición farmacéutica que se tiene que usar para administración *in vivo* típicamente tiene que ser estéril. Esto se puede conseguir mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización que utiliza este método se puede conducir antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral se pueda almacenar en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales en general se colocan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforables mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, la misma se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, un sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

En una realización específica, la presente invención se refiere a kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen kits que contienen jeringas precargadas de cámara única o multicámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que se tiene que emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosis apropiados para tratamiento variarán por tanto, dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual el polipéptido se está usando, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órgano) y la condición (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las composiciones polipeptídicas se pueden inyectar preferentemente o administrar por vía intravenosa. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o cada dos semanas dependiendo de la semivida y la velocidad de eliminación de la formulación particular. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del polipéptido en la formulación usada. Típicamente, una composición se administra hasta que una dosis que consigue el efecto deseado se consigue. La composición, por lo tanto, se puede administrar como una sola dosis o como dosis múltiples (a concentraciones/dosis iguales o diferentes) a lo largo del tiempo o como una infusión continua. El refinamiento adicional de la dosis apropiada se realiza de forma rutinaria. Las dosis apropiadas se pueden determinar a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo por

vía oral, a través de inyección mediante vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intra cerebro ventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, por vía intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea o intraperitoneal; así como también por medios intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, uretrales, vaginales o rectales, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implante. Cuando se desee, las composiciones se pueden administrar mediante inyección de bolo o de forma continua mediante infusión o mediante un dispositivo de implante. Como alternativa o adicionalmente, la composición se puede administrar por vía local a través del implante de una membrana, esponja u otro material apropiado en el cual se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado y la administración de la molécula deseada puede ser a través de difusión, bolo de liberación temporalizada o administración continua.

En algunos casos, los polipéptidos del ActRIIB5 de la presente invención se pueden administrar implantando determinadas células que se han modificado por ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. Tales células pueden ser células animales o humanas y pueden ser autólogas, heterólogas o xenógenas. Opcionalmente, las células pueden ser inmortalizadas. Con el fin de reducir la posibilidad de una respuesta inmune, las células se pueden encapsular para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente compartimentos o membranas poliméricas semipermeables biocompatibles que permiten la liberación del producto o productos de proteína pero evitan la destrucción de las células mediante el sistema inmune del paciente o mediante otros factores dañinos de los tejidos circundantes.

También se prevé la terapia génica de ActRIIB5 *in vivo* en la que una molécula de ácido nucleico que codifica ActRIIB5 o una variante o un derivado de ActRIIB5 se introducen directamente en el sujeto. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ActRIIB5 se introduce en células dianas a través de inyección local de una construcción de ácido nucleico con o sin un vector de administración apropiado, tal como un vector de virus adeno asociado. Los vectores virales alternativos incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirales, herpes simples, virus y vectores de virus del papiloma. La transferencia física del vector de virus se puede conseguir *in vivo* mediante inyección local de la construcción de ácido nucleico deseada u otro vector de administración apropiado que contiene la secuencia de ácido nucleico deseada, transferencia mediada por liposoma, inyección directa (ADN desnudo) o bomba de micropartículas (pistola génica).

### **Uso de composiciones de ActRIIB5**

La presente invención proporciona composiciones para reducir o neutralizar la cantidad o actividad de miostatina, activina A o GDF-11 *in vivo* o *in vitro* poniendo en contacto las proteínas con una proteína de ActRIIB5. Los Ejemplos más adelante demuestran que las proteínas de ActRIIB5 tienen una afinidad elevada por miostatina, activina A y GDF-11 y son capaces de reducir o inhibir las actividades biológicas de miostatina, activina A y GDF-11. Los Ejemplos demuestran que ActRIIB5 tiene una actividad más elevada en comparación con ActRIIB-ECD como se demuestra mediante los valores de  $CI_{50}$  en el Ejemplo 3 y la respuesta biológica en animales es mejor para los animales ActRIIB5 en comparación con los animales ActRIIB-ECD como se demuestra en los Ejemplos 5 y 6.

En un aspecto, la presente invención proporciona reactivos para tratar trastornos relacionados con miostatina y/o relacionados con activina A en un sujeto que lo necesita administrando una dosis eficaz de una composición de ActRIIB5 al sujeto. Como se usa en el presente documento el término "sujeto" se refiere a cualquier animal, tal como mamíferos incluyendo seres humanos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de proteínas de ActRIIB en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de pérdida de músculo, trastornos metabólicos y trastornos relacionados con activina A enumerados más adelante. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de ácidos nucleicos y vectores de ActRIIB en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de pérdida de músculo, trastornos metabólicos y relacionados con activina A enumerados más adelante.

Las composiciones de la presente invención se ha demostrado que aumentan la masa de músculo magro como un porcentaje del peso corporal y reducen la masa grasa como un porcentaje del peso corporal en modelos animales como se demuestra en los Ejemplos más adelante.

Los trastornos que se pueden tratar mediante una composición de ActRIIB5 incluyen pero sin limitación diversas formas de pérdida de músculo, así como también trastornos metabólicos tales como diabetes y trastornos relacionados y enfermedades degenerativas óseas tales como osteoporosis. Los 23 trastornos de pérdida de músculo incluyen distrofias tales como distrofia muscular de Dichenne, distrofia muscular progresiva, distrofia muscular de tipo Becker, distrofia muscular de Dejerine-Landouzy, distrofia muscular de Erb y distrofia muscular neuroaxonal infantil. Los trastornos de pérdida de músculo adicionales surgen de enfermedades o trastornos crónicos tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, cáncer, SIDA, insuficiencia renal, atrofia de órganos, privación de andrógeno y artritis reumatoide.

La sobreexpresión de miostatina puede contribuir a caquexia, un síndrome de pérdida de músculo y de grasa grave.

- En un Ejemplo, las concentraciones séricas e intramusculares de proteína inmunorreactiva miostatina se observó que estaban aumentadas en hombres que mostraban pérdida de músculo relacionada con SIDA y estaba relacionada de forma inversa con la masa libre de grasa ((Gonzalez-Cadavid *et al.*, PNAS USA 95: 14938-14943 (1998)). Los niveles de miostatina también se ha demostrado que aumentan en respuesta a lesiones por quemaduras, dando como resultado un efecto muscular catabólico (Lang *et al.*, FASEB J 15,1807-1809 (2001)). Las afecciones adicionales que dan como resultado la pérdida de músculo pueden surgir de inactividad debido a incapacidad tal como confinamiento con una silla de ruedas, reposo en cama prolongado debido a apoplejía, enfermedad, lesión de médula espinal, fractura ósea o trauma y atrofia muscular en un entorno de microgravedad (vuelo espacial). Por ejemplo, la proteína inmunorreactiva de miostatina en plasma se observó que aumenta después de reposo en cama prolongado (Zachwieja *et al.* J Gravit Physiol. 6(2): 11 (1999). También se observó que los músculos de ratas expuestos a entorno de microgravedad durante un vuelo espacial expresaban una cantidad aumentada de miostatina en comparación con los músculos de ratas que no estaban expuestos (Lalani *et al.*, J.Endocrin 167 (3): 417-28 (2000)).
- Además, los aumentos relacionados con la edad de proporciones de grasa a músculo y la atrofia muscular relacionada con la edad parecen estar relacionados con la miostatina. Por ejemplo, la proteína inmunorreactiva a miostatina sérica promedio aumentaba con la edad en grupos de hombres y mujeres jóvenes (19-35 años de edad), de edad media (36-75 años de edad) y ancianos (76-92 años de edad), mientras que la masa muscular promedio y la masa libre de grasa se reducía con la edad en estos grupos (Yarasheski *et al.* J Nutr Aging 6(5):343-8 (2002)). Además, se ha observado ahora que la miostatina se expresa a niveles bajos en músculo cardíaco y la expresión está regulada positivamente después de cardiomiocitos después de infarto (Sharma *et al.*, J Cell Physiol. 180 (1): 1 - 9 (1999)). Por lo tanto, la reducción de los niveles de miostatina en el músculo cardíaco puede mejorar la recuperación del músculo cardíaco después de infarto.
- La miostatina parece también influir sobre los trastornos metabólicos incluyendo diabetes de tipo 2, diabetes mellitus no dependiente de insulina, hiperglucemia y obesidad. Por ejemplo, la carencia de miostatina se ha demostrado que mejora los fenotipos obeso y diabético de dos modelos de ratón (Yen *et al.* mencionado anteriormente). Se ha demostrado en los Ejemplos más adelante que la administración de vectores AAV-ActRIIB5 aumenta la proporción de músculo a grasa en un animal, en particular para modelos animales obesos. Por lo tanto, la reducción de la composición de grasa mediante la administración de las composiciones de la presente invención mejorará las condiciones de diabetes, obesidad e hiperglucémicas en animales. Además los Ejemplos más adelante y la Figura 4B demuestran que las composiciones que contienen ActRIIB5 pueden reducir la ingesta de alimentos en individuos obesos.
- Adicionalmente, el aumento de la masa muscular mediante la reducción de los niveles de miostatina puede mejorar la fuerza ósea y reducir la osteoporosis y otras enfermedades óseas degenerativas. Se ha observado, por ejemplo, que los ratones sin miostatina mostraban contenido mineral y densidad aumentada del húmero de ratón y contenido mineral aumentado de tanto hueso trabecular como hueso cortical en las regiones en las que se unen los músculos, así como también masa muscular aumentada (Hamrick *et al.* Calcif Tissue Int 71 (1): 63-8 (2002)). Adicionalmente, las composiciones de ActIIBR de la presente invención se pueden usar para tratar los efectos de privación de andrógeno tal como terapia de privación de andrógeno usada para el tratamiento de cáncer de próstata.
- La presente invención también proporciona composiciones para aumentar la masa muscular en animales de alimentación mediante la administración de una dosis eficaz de las proteínas de ActRIIB5 al animal. Debido a que el polipéptido de miostatina C-terminal maduro es idéntico en todas las especies ensayadas, las proteínas de ActRIIB5 se esperaría que fueran eficaces para aumentar la masa muscular y reducir la grasa en cualquier especie importante para la agricultura incluyendo ganado, pollos, pavos y cerdos.
- Las proteínas de ActRIIB5 y las composiciones de la presente invención también antagonizan la actividad de activina A. Se conoce que la activina A se expresa en determinados tipos de cánceres, particularmente tumores gonadales tales como carcinomas ováricos y que provocan caquexia grave (Ciprano *et al.* Endocrinol 141 (7): 2319-27 (2000), Shou *et al.*, Endocrinol 138 (11): 5000-5 (1997); Coerver *et al.*, Mol Endocrinol 10(5): 534-43 (1996); Ito *et al.* British J Cancer 82(8): 1415-20 (2000), Lambert-Messerlian, *et al.*, Gynecologic Oncology 74 91): 93-7 (1999). El Ejemplo 4 más adelante muestra que la expresión de activina A en los modelos animales da como resultado una caquexia grave. La expresión de ActRIIB5/Fc en los animales contrarresta esa caquexia, como se muestra en los Ejemplos 5 y 6. La sobreexpresión de miostatina también se piensa que contribuye a la caquexia, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto las composiciones se pueden usar para tratar afecciones relacionadas con sobreexpresión de activina A, así como también sobreexpresión de miostatina, tal como caquexia a partir de determinados cánceres y el tratamiento de determinados tumores de tipo gonadal.
- Las composiciones de la presente invención se pueden usar en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar sus efectos terapéuticos o reducir los efectos secundarios potenciales. Estas propiedades incluyen actividad aumentada, solubilidad aumentada, degradación reducida, semivida aumentada, toxicidad reducida e inmunogenicidad reducida. Por tanto las composiciones de la presente invención son útiles para regímenes de tratamiento prolongados. Adicionalmente, las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de los compuestos de la invención están bien equilibradas, potenciando de ese modo su utilidad para usos tanto *in vitro*

como especialmente *in vivo*. Específicamente, los compuestos de la invención tienen un grado apropiado de solubilidad en medios acuosos que permite la absorción y biodisponibilidad en el organismo, a la vez que también tienen un grado de solubilidad en lípidos que permite que los compuestos atraviesen la membrana celular a un sitio de acción putativo, tal como una masa muscular particular.

5 Adicionalmente, las proteínas de ActRIIB5 y los polipéptidos de la presente invención son útiles para detectar y cuantificar miostatina, activina A o GDF-11 en cualquier cantidad de ensayos. En general, los polipéptidos de ActRIIB5 de la presente invención son útiles como agentes de captura para unirse e inmovilizar miostatina, activina A o GDF-11 en una diversidad de ensayos, similares a los descritos, por ejemplo, en Asai, ed., *Methods In Cell Biology*, 37, Antibodies In Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993). Los polipéptidos se pueden marcar de alguna manera o pueden reaccionar con una tercera molécula tal como un anticuerpo que está marcado para posibilitar que se detecte y se cuantifique la miostatina. Por ejemplo, un polipéptido o una tercera molécula se pueden modificar con un resto detectable, tal como biotina, que después se puede unir a una cuarta molécula, tal como estreptavidina marcada con enzima u otras proteínas (Akerstrom, *J Immunol* 135: 2589 (1985); Chaubert, *Mod Pathol* 10: 585 (1997)).

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

### **Ejemplo 1: aislamiento de ADNc y expresión en células**

20 El ADNc del receptor humano de activina de tipo IIB novedoso se aisló a partir de una biblioteca de ADNc de origen de testículo humano (Clontech, Inc.) de acuerdo con el siguiente protocolo. Los cebadores del extremo N y el extremo C del receptor humano de activina IIB (SEC ID N°: 4) se generaron y se realizó PCR usando estos cebadores frente a moldes a partir de bibliotecas de ADNc humanas. Se realizó PCT usando el sistema de PCR GC-RICH (Roche, N° de cat. 2140306). Los productos de PCR tanto N como C terminal se digirieron con PvuII/EcoRI y se subclonaron en vector pCDNA3.1-HisA (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) para preparar un clon de longitud completa. Después de secuenciar varios productos de PCR, se identificó un clon de ADNc a partir de la biblioteca de ADNc de testículos humanos como un receptor de variante de corte y empalme N terminal novedoso. La secuencia polinucleotídica de este receptor, se denominó receptor humano de activina de tipo IIB5 (ActRIIB5). Al clon de ADNc de este receptor le faltaban 152 bases nucleotídicas que corresponden al Exón 4 completo en el gen de receptor humano de activina de tipo IIB de tipo silvestre. El truncamiento del Exón 4 en la variante de corte y empalme dio como resultado la supresión de la secuencia de aminoácidos que abarca la región transmembrana así como también un cambio de fase que conduce a una terminación traduccional temprana. La secuencia de aminoácidos del receptor de variante de corte y empalme contiene la mayoría del dominio extracelular, codificado por los exones 1, 2 y 3 del receptor humano de activina de tipo IIB de tipo silvestre y una región de cola adicional de 36 aminoácidos dando como resultado el cambio de fase. La secuencia de aminoácidos se expone en SEC ID N°: 2. La secuencia C terminal se expone en SEC ID N°: 3. Debido a la carencia de región transmembrana, el ActRIIB5 codifica una forma soluble del receptor de activina de tipo IIB. La transfección de ADNc de ActRIIB5 en células condujo a la expresión de la forma de la proteína receptora secretada en lugar de la forma unida a membrana.

### **Ejemplo 2: Expresión de ActRIIB5**

ADNc que codifica ActRIIB5 se clonó en vectores pDC323 o pDC324 de mamífero (Bianchi *et al*, *Biotech and Bioengineering*, Vol 84(4): 439-444 (2003)) y se expresó en una línea de células 293T. Para generar las fusiones de Fc, los polinucleótidos que codifican el ActRIIB5 (SEC ID N°: 1) se clonaron adyacentes a los polinucleótidos que codifican la secuencia enlazadora (Gly)<sub>8</sub> adyacente a los polinucleótidos que codifican el Fc de IgG1 humana en un vector pDSRa (descrito en el documento WO/9014363, incorporado en el presente documento por referencia). Los polinucleótidos que codifican ActRIIB-ECD (aminoácidos 1-124 de SEC ID N°: 5) se clonaron adyacentes a los polinucleótidos el Fc de IgG humana en un vector pDSRa (sin enlazador). Estas construcciones se transfectaron en una línea de células CHO estable. Las fusiones de receptor-Fc solubles expresadas se usaron para el ensayo lado a lado *in vitro* descrito más adelante.

Para los experimentos animales *in vivo* descritos en el Ejemplo 4 más adelante, los productos de PCR generados como se ha descrito anteriormente se digirieron con NheI/SalI y se subclonaron en un vector AA V-Fc en los mismos sitios. El vector AAV-Fc permite la transferencia del gen de ActRIIB5 en un animal para expresión *in vivo*.

### **Ejemplo 3: Actividades *In vitro***

Se generaron HuActRIIB5/Fc y HuActRIIB-ECD/Fc como se ha descrito anteriormente. La capacidad del receptor de ActRIIB5 de inhibir la unión de cada uno de los tres ligandos miostatina, activina A y GDF-11 al receptor de activina IIB se ensayó usando un ensayo de actividad basado en células como se ha descrito más adelante.

### **Ensayo de Actividad Basado en Células C2C12**

65 Se generó una línea de células informadoras sensibles a miostatina/activina/GDF-11 mediante transfección de células mioblásticas C2C12 (ATCC N°: CRL-1772) con una construcción pMARE-luc. La construcción pMARE-luc se

preparó clonando doce repeticiones de la secuencia CAGA, que representa los elementos de respuesta de miostatina/activina (Dennler *et al.* EMBO 17: 3091-3100 (1998)) en un vector informador pLuc-MCS (Stratagene N° de cat. 219087) cadena arriba de la caja TATA. Las células C2C12 mioblásticas expresan de forma natural el receptor IIB de miostatina/activina/GDF-11 en su superficie celular. Cuando miostatina/activina/GDF-11 se une a los receptores celulares, se activa la ruta Smad y el Smad fosforilado se une al elemento de respuesta (Macias-Silva *et al.* Cell 87: 1215 (1996)), dando como resultado la expresión del gen de luciferasa. La actividad de luciferasa después se mide usando un kit de ensayo informador de luciferasa comercial (N° de cat E4550, Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una línea estable de células C2C12 que se había transfectado con pMARE-luc (clon C2C12/pMARE N° 44) se usó para medir la actividad de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las células informadoras se sembraron en cultivos de 96 pocillos. La selección usando diluciones de cada tipo de receptor soluble se realizó con la concentración fijada a miostatina 4 nM, activina 20 nM y GDF-11 4 nM. Cada uno de miostatina, activina y GDF-11 se preincubaron con los receptores solubles a varias concentraciones. La actividad de miostatina/activina/GDF-11 se midió determinando la actividad de luciferasa en los cultivos tratados. Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron para cada receptor soluble como se ha expuesto en la Tabla 1 más adelante.

TABLA1

Proteína receptora soluble	$CI_{50}$ de actividad neutralizante de activina A (nM) frente a activina 20 nM
huActRIIB5/Fc	156,2
huActRIIB-ECD/Fc	339,6
proteína receptora soluble	$CI_{50}$ de actividad neutralizante de miostatina (nM) frente a miostatina 4 nM
huActRIIB5/Fc	29,72
huActRIIB-ECD/Fc	51,06
proteína receptora soluble	$CI_{50}$ de actividad neutralizante de GDF-11 (nM) frente a GDF-11 4 nM
huActRIIB5/Fc	90,6
huActRIIB-ECD/Fc	89,88

La tabla anterior muestra que los receptores solubles pueden bloquear la señalización de miostatina a través de su receptor pero también la señalización de activina A y GDF-11.

#### Ensayo Biacore®

Se llevaron a cabo ensayos de bloqueo usando ActRIIB-ECD/Fc humano inmovilizado (R&D Systems, Minneapolis, Mn.) en una microplaca CM5 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) en presencia y ausencia de cada uno de los dos receptores solubles ActRIIB-ECD/Fc y ActRIIB5/Fc usando el sistema de ensayo Biacore® de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La señal de unión de miostatina del 100% se determinó en ausencia del receptor en solución. Diversas concentraciones de los receptores solubles se diluyeron en tampón de ensayo y se incubaron con miostatina 4 nM antes de inyectarse sobre la superficie del receptor. Debido a que únicamente las moléculas de miostatina libres fueron capaces de unirse a la microplaca, una respuesta de unión disminuida con concentración creciente de los receptores indicaba la unión de los receptores a miostatina en solución. Mediante la representación de la señal de unión frente a la concentración del receptor soluble, se calculó que ActRIIB-ECD/Fc y ActRIIB5/Fc tenían una  $CE_{50}$  de aproximadamente 18 nM y 7 nM respectivamente. La comparación entre los dos receptores se muestra en la Figura 1.

#### Ejemplo 4: Sobreexpresión de activina A en ratones C57Bl/6

Para explorar el papel después del nacimiento de activina en animales después del nacimiento, activina A se sobreexpresó en ratones usando transferencia génica mediada por AAV. Ratones C57Bl/6 hembra adultos jóvenes (5 semanas de edad) de edad igualada (Charles River laboratories, Wilmington, Mass) se separaron en dos grupos equilibrados por peso ( $n=6$ /grupo), a los cuales se inyectó posteriormente a través de la vena porta vector de AAV-activina A o AAV-vacío (control) a  $1 \times 10^{13}$  pfu/ratón. Los efectos sobre el peso corporal y la composición corporal se analizaron. El grupo transducido con AAV-activina mostró una reducción drástica en el peso corporal en comparación con los ratones de control transducidos con vector de AAV vacío. Dos semanas después de la inyección con AAV, el grupo transducido con activina A se volvió tan gravemente caquéxico que su peso corporal promedio fue únicamente aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del grupo de control transducido con vector vacío. La necropsia reveló que la administración de AAV-Activina A dio como resultado un agotamiento espectacular en aproximadamente el 60% de masa corporal magra, masa de músculo esquelético y masa de grasa. Adicionalmente,



los ratones transducidos con activina también mostraron pérdida grave de órganos como se indica mediante los pesos de órganos significativamente reducido tales como hígado y corazón.

5 Se realizó un experimento adicional usando una cantidad reducida ( $1 \times 10^{12}$  pfu/ratón) de virus de AAV-Activina A. Los resultados mostraron una reducción en el peso corporal y la masa corporal que se produce como resultado de la transducción con activina pero los efectos fueron menos espectaculares en comparación con el experimento inicial usando una dosis más elevada de AAA-activina ( $1 \times 10^{13}$  pfu/ratón). Esto demuestra que el efecto caquéxico después del nacimiento de la activina A es dependiente de la dosis.

10 **Ejemplo 5: Efecto Anabólico de AA V-ActRIIB5 en ratones C57BI/6**

15 Ratones macho C57BI/6 de edad igualada (5 semanas de edad) se dividieron en 5 grupos (n=10 por grupo). Partículas virales de AAV se envasaron y titularon antes de la inyección de la forma siguiente: AAV-vacío, AAV-activina A, AAV-ActRIIB5/Fc, AAV-ActRIIB-ECD/Fc y AAV-ProMio/Fc, en el que AAV-ProMio significa propéptido de miostatina. Cada uno de los virus AAV anteriores se inyectaron a  $8 \times 10^{12}$  pfu/ratón excepto por AAV-activina A, del cual se inyectó una cantidad reducida de partículas virales a  $1 \times 10^{12}$  pfu/ratón (n=10/grupo). Las partículas virales se inyectaron a través de la vena porta. Los pesos corporales se determinaron cada dos días. Los resultados se muestran en la Figura 2. El grupo de AAV-ActRIIB5/Fc y el grupo de AAV-ActRIIB-ECD/Fc desarrollaron pesos corporales aumentados en comparación con el grupo de control de AAV-Vector, así como también un peso corporal aumentado en comparación con el grupo de AAV-ProMio/Fc. Comparando los dos grupos de receptor soluble, el grupo de AAV-ActRIIB5/Fc mostró la mayor cantidad de aumento de ganancia de peso corporal. Por el contrario, el grupo de control de AAV-Vector mostró una reducción espectacular en los pesos corporales en comparación con el grupo de control de AAV-Vector.

25 Siete semanas después de la inyección viral, los cambios del peso corporal de grupos individuales se representaron como porcentaje del grupo de control (grupo de vector de AAV vacío). El grupo de AAV-ActRIIB5/Fc mostró el aumento de peso corporal promedio más elevado con respecto al control, aproximadamente el 25%, en comparación con el 21% de aumento de peso corporal para el grupo ActRIIB-ECD/Fc. El grupo AAV-ActRIIB5/Fc y el grupo AAV-ActRIIB-ECD/Fc mostraron aumentos de peso corporal mayores que el provocado por el grupo ProMio/Fc de aproximadamente el 16%. Por el contrario, el grupo de AAV-activina tuvo una caída significativa en el peso corporal en el 19%. Una comparación de estos cambios se muestra en la Figura 3.

35 Un mes después de la inyección viral, la masa corporal magra en cada grupo de diez ratones se determinó usando resonancia magnética nuclear (RMN) midiendo la composición corporal de ratones vivos. Al mismo tiempo, se determinó el contenido de grasa corporal de los ratones en cada grupo. Las mediciones se tomaron en ratones vivos usando el EchoMRI2003 (Echo Medical Systems, Houston, Tx). El EchoMRI 2004 es un analizador de composición corporal completa que mide las masas de grasa y tejidos magros en animales vivos usando tecnología de RMN. El porcentaje promedio de masa magra y grasa como porcentaje del peso corporal para cada grupo de 10 ratones se presenta en la Tabla 2 más adelante.

40

TABLA 2

	Grasa (% de peso corporal)	masa magra (% de peso corporal)
AAV-promiostatina/Fc	9,11	90,33
AAV-Activina A	10,21	87,92
AAV-vacío	11,76	86,74
AAV-ActRIIB5/Fc	7,82	91,05
AAV-ActRIIB-ECD/Fc	8,51	90,18

45 Como se puede observar a partir de la Tabla 2 anteriormente, el grupo AAV-ActRIIB5/Fc de ratones mostró el porcentaje más pequeño de grasa corporal y el porcentaje más grande de masa magra para todos los grupos después de un mes. Estos datos muestran que ActRIIB5/Fc es eficaz para potenciar el peso corporal, la masa corporal magra y reducir la masa de grasas en los animales ensayados.

50 En un experimento relacionado, los cinco grupos de diez ratones por grupo se ensayaron para determinar fuerza de agarre usando un medidor Columbia Instruments meter, modelo 1027 dsm (Columbus, Ohio). Los resultados se promediaron para cada grupo. El grupo de AAV-promiostatina/Fc promedió una fuerza de agarre en comparación con los ratones de control AAV-vacío de aproximadamente el 21% para el grupo de promiostatina/Fc, aproximadamente el 31% para el grupo de ActRIIB-ECD/Fc y aproximadamente el 33% para el grupo de ratones de ActRIIB5/Fc. El aumento en la fuerza de agarre medido fue aproximadamente el 46% para el grupo de promiostatina/Fc, aproximadamente el 56% para el grupo ActRI IIB-ECD/Fc y aproximadamente el 60% para el grupo ActRIIB5/Fc.

55

**Ejemplo VI: Cambios en el peso corporal y composición en ratones obesos Ay**

5 Dos grupos de ratones obesos Ay (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) de 11 animales cada uno (8 animales por grupo a la finalización del experimento) se inyectaron con un vector AAV-vacío y un vector AA V-ActRIIB5/Fc respectivamente. Los virus se inyectaron a  $8 \times 10^{12}$  pfu / ratón en la vena porta de cada ratón. Después los ratones se supervisaron para determinar en peso corporal, ingesta de alimento, masa muscular magra y masa grasa a lo largo de un periodo de tres meses después de la inyección. La ingesta de alimentos se determinó pesando el alimento restante no comido en la jaula del ratón en una base diaria y calculando la ingesta semanal. La masa muscular magra y la masa grasa se determinaron mediante RMN como se ha descrito anteriormente. Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 4 y 5. La Figura 4A muestra una reducción en el peso corporal y la Figura 4B muestra una reducción en la ingesta de alimento semanal en los ratones AAV-ActRIIB5/Fc en comparación con los ratones de control. La Figura 5A muestra aumento en masa magra, determinado por RMN para AAV-ActRIIB5/Fc, mientras que la Figura 5B muestra una reducción grande de masa grasa para AAV-ActRIIB5/Fc en comparación con los ratones de control, en aproximadamente el 50%.

15 A la finalización del experimento, los ratones se sacrificaron y se examinaron para determinar cambios internos. Los hígados de los ratones tratados con AAV-ActRIIB5/Fc se compararon con aquellos tratados con control de AAV-vacío. La inspección visual de los hígados de los ratones tratados con AAV-vacío y los ratones tratados con AAV-ActRIIB5/Fc mostró que los hígados de los ratones AAV-vacío de control contenían depósitos de grasa dentro del los hígados, mientras que los ratones tratados con AAV-ActRIIB5/Fc estaban libres de depósitos de grasa. Por lo tanto, la expresión del ActRIIB5/Fc en los ratones Ay corrigió los hígados grasos que caracterizan a los ratones obesos Ay, así como causó una reducción en el peso corporal global, una reducción en la cantidad de alimento consumido, un aumento en la masa muscular magra y una reducción grande en la masa grasa.

25 La presente invención no está limitada por el alcance de las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que tienen por objeto ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, adicionalmente aquellas mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos. Tales modificaciones tienen por objeto estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110>AMGENINC.  
HAN, HQ  
KWAK, KEITH SOO-NYUNG  
ZHOU, XIAOLAN
- 40 <120> RECEPTOR DE ACTIVINA NOVEDOSO Y USOS DEL MISMO
- <130>A-1047-WO-PCT
- <140> -por asignar-
- 45 <141> 01-11-2006
- <150> US 60/732.270
- <151> 01-11-2005
- 50 <160>6
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210>1
- 55 <211>1387
- <212>ADN
- <213> Homo sapiens
- 60 <220>
- <221>CDS
- <222>(1)..(480)
- <400> 1

ES 2 385 581 T3

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

ES 2 385 581 T3

ttc act cat ttg cca gag gct ggg ggc ccg gaa gga ccc tgg gcc tcc	384
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser	
115 120 125	
acc acc atc ccc tct ggt ggg cct gaa gcc act gca gct gct gga gat	432
Thr Thr Ile Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp	
130 135 140	
caa ggc tcg ggg gcg ctt tgg ctg tgt ctg gaa ggc cca gct cat gaa	480
Gln Gly Ser Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu	
145 150 155 160	
tgactttgta gctgtcaaga tcttccact ccaggacaag cagtcgtggc agagtgaacg	540
ggagatcttc agcacacctg gcatgaagca cgagaacctg ctacagttca ttgctgccga	600
gaagcgaggc tccaacctcg aagtagagct gtggctcacc acggccttcc atgacaaggg	660
ctccctcacg gattacctca aggggaacat catcacatgg aacgaactgt gtcattgagc	720
agagacgatg tcacgaggcc tctcatacct gcatgaggat gtgccttggg gccgtggcga	780
gggccacaag cgtctattg cccacagga ctttaaaagt aagaatgtat tgctgaagag	840
cgacctcaca gccgtgctgg ctgactttgg cttggctggt cgatttgagc cagggaaacc	900
tccaggggac acccacggac aggtaggcac gagacggtac atggctcctg aggtgctcga	960
gggagccatc aacttcocaga gagatgcctt cctgogcatt gacatgtatg ccattggggtt	1020
ggtgctgtgg gagcttgtgt ctgctgcaa ggctgcagac ggaccctggt atgagtacat	1080
gctgcccttt gaggaagaga ttggccagca ccttctgttg gaggagctgc aggaggtggt	1140
ggtgcacaag aagatgaggc ccaccattaa agatcactgg ttgaaacacc cgggcctggc	1200
ccagctttgt gtgaccatcg aggagtgtg ggaccatgat gcagaggctc gcttgtccgc	1260
gggctgtgtg gaggagcggg tgtccctgat tggaggtcg gtcaatggca ctacctcgga	1320
ctgtctcgtt tccctggtga cctctgtcac caatgtggac ctgcccccta aagagtcaag	1380
catctaa	1387

<210>2  
 <211> 160  
 <212>PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

5

ES 2 385 581 T3

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

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

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser  
115 120 125

Thr Thr Ile Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp  
130 135 140

Gln Gly Ser Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu  
145 150 155 160

<210>3  
<211> 36  
<212>PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 3

Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly  
20 25 30

Pro Ala His Glu  
35

10

<210>4  
<211> 1539  
<212>ADN  
<213> Homo sapiens

15

<220>  
<221>CDS  
<222>(1)..(1539)

ES 2 385 581 T3

<400> 4

```
atg acg gcg ccc tgg gtg gcc ctc gcc ctc ctc tgg gga tcg ctg tgc      48
Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1           5           10           15
```

ES 2 385 581 T3

gcc ggc tct ggg cgt ggg gag gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr 20 25 30	96
aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg 35 40 45	144
tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg 50 55 60	192
aac agc tct ggc acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp 65 70 75 80	240
gac ttc aac tgc tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn 85 90 95	288
ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg 100 105 110	336
ttc act cat ttg cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro 115 120 125	384
ccc ccg aca gcc ccc acc ctg ctc acg gtg ctg gcc tac tca ctg ctg Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu 130 135 140	432
ccc atc ggg ggc ctt tcc ctc atc gtc ctg ctg gcc ttt tgg atg tac Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr 145 150 155 160	480
egg cat cgc aag ccc ccc tac ggt cat gtg gac atc cat gag gac cct Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro 165 170 175	528
ggg cct cca cca cca tcc cct ctg gtg ggc ctg aag cca ctg cag ctg Gly Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu 180 185 190	576
ctg gag atc aag gct cgg ggg cgc ttt ggc tgt gtc tgg aag gcc cag Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln 195 200 205	624
ctc atg aat gac ttt gta gct gtc aag atc ttc cca ctc cag gac aag Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys 210 215 220	672
cag tcy tgg cag agt gaa cgg gag atc ttc agc aca cct ggc atg aag Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys 225 230 235 240	720
cac gag aac ctg cta cag ttc att gct gcc gag aag cga ggc tcc aac His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn 245 250 255	768

ctc gaa gta gag ctg tgg ctc atc acg gcc ttc cat gac aag ggc tcc Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser 260 265 270	816
ctc acg gat tac ctc aag ggg aac atc atc aca tgg aac gaa ctg tgt Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys 275 280 285	864
cat gta gca gag acg atg tca cga ggc ctc tca tac ctg cat gag gat His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp 290 295 300	912
gtg ccc tgg tgc cgt ggc gag ggc cac aag ccg tct att gcc cac agg Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg 305 310 315 320	960
gac ttt aaa agt aag aat gta ttg ctg aag agc gac ctc aca gcc gtg Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val 325 330 335	1008
ctg gct gac ttt ggc ttg gct gtt cga ttt gag cca ggg aaa cct cca Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro 340 345 350	1056
ggg gac acc cac gga cag gta ggc acg aga cgg tac atg gct cct gag Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu 355 360 365	1104
gtg ctc gag gga gcc atc aac ttc cag aga gat gcc ttc ctg cgc att Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile 370 375 380	1152
gac atg tat gcc atg ggg ttg gtg ctg tgg gag ctt gtg tct cgc tgc Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys 385 390 395 400	1200
aag gct gca gac gga ccc gtg gat gag tac atg ctg ccc ttt gag gaa Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu 405 410 415	1248
gag att ggc cag cac cct tcg ttg gag gag ctg cag gag gtg gtg gtg Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val 420 425 430	1296
cac aag aag atg agg ccc acc att aaa gat cac tgg ttg aaa cac ccg His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro 435 440 445	1344
ggc ctg gcc cag ctt tgt gtg acc atc gag gag tgc tgg gac cat gat Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp 450 455 460	1392
gca gag gct cgc ttg tcc gcg ggc tgt gtg gag gag cgg gtg tcc ctg Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu 465 470 475 480	1440
att cgg agg tcg gtc aat ggc act acc tcg gac tgt ctc gtt tcc ctg Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu 485 490 495	1488
gtg acc tct gtc acc aat gtg gac ctg ccc cct aaa gag tca agc atc Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile 500 505 510	1536
taa	1539



ES 2 385 581 T3

<210>5  
 <211> 512  
 <212>PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 385 581 T3

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln  
 195 200 205  
 Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys  
 210 215 220  
 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys  
 225 230 235 240  
 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn  
 245 250 255  
 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser  
 260 265 270  
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys  
 275 280 285  
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp  
 290 295 300  
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg  
 305 310 315 320  
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val  
 325 330 335  
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro  
 340 345 350  
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu  
 355 360 365  
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile  
 370 375 380  
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu  
 405 410 415  
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Gln Val Val Val  
 420 425 430

ES 2 385 581 T3

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

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

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

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

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

<210>6  
 <211> 512  
 <212>PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 385 581 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 385 581 T3

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

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

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

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

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

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

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

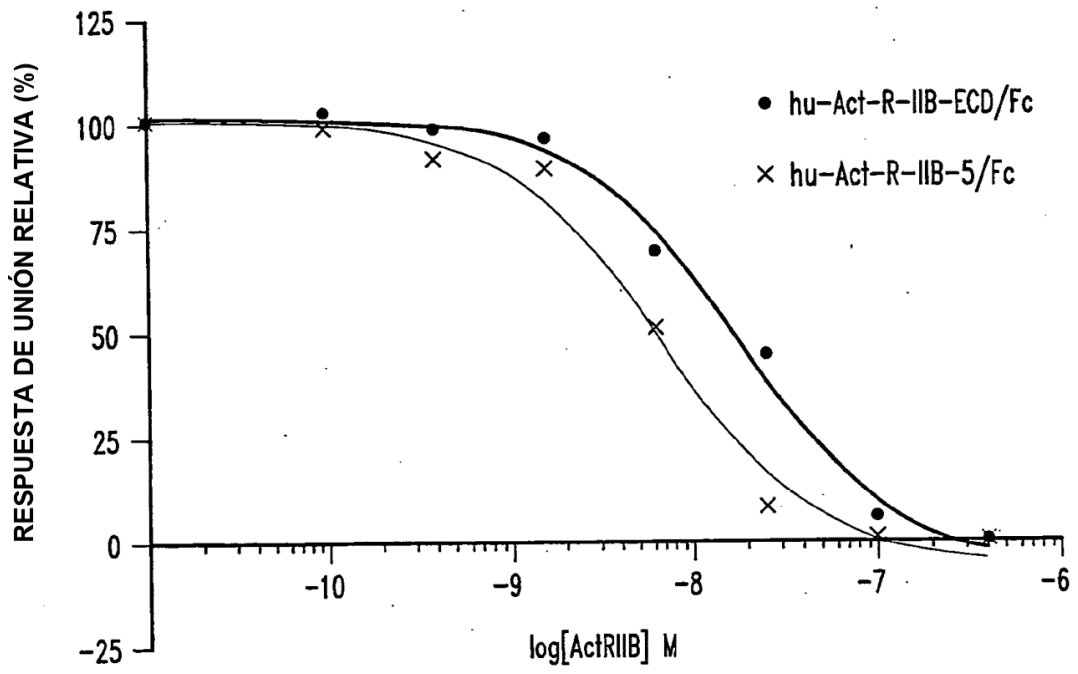
Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
 500 505 510

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 5
- (a) un polinucleótido que tiene la secuencia polinucleotídica expuesta en SEC ID N°: 1 o su complemento;
  - (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2;
  - 10 (c) la secuencia polinucleotídica que se hibrida a (a) o (b) en condiciones de rigurosidad moderada en aproximadamente el 50% de formamida, SSC 6X a aproximadamente 42 °C y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, SSC 0,5X, SDS al 0,1 % y en el que el polipéptido codificado comprende un extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11; y
  - 15 (d) la secuencia polinucleotídica que se hibrida a (a) o (b) en condiciones de rigurosidad moderada en aproximadamente el 50% de formamida, SSC 6X a aproximadamente 42 °C y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, SSC 0,5X, SDS al 0,1 % y en el que el polipéptido codificado comprende un extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.
- 20 2. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2, en el que el polinucleótido comprende un extremo C que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 o en el que el polinucleótido comprende un extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a SEC ID N°: 3.
- 25 3. La molécula de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico comprende además polinucleótidos que codifican al menos una proteína heteróloga en fase con los polinucleótidos que codifican un receptor de activina de tipo IIB5, opcionalmente en el que la proteína heteróloga es un polipéptido de Fc, estando el polipéptido de Fc opcionalmente unido por un péptido enlazador.
- 30 4. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que consiste en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1.
- 35 5. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polinucleótido está unido operativamente a una secuencia reguladora transcripcional o traduccional, opcionalmente en el que la secuencia transcripcional o traduccional comprende un promotor o potenciador transcripcional.
- 40 6. Un vector recombinante que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una proteína aislada que comprende un polipéptido de receptor de activina de tipo IIB5, en el que el polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 45 (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2, opcionalmente en el que el resto de aminoácido 64 en SEC ID N°: 2 es alanina;
  - (b) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con SEC ID N°: 2, en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11;
  - (c) el polipéptido de (b), en el que el extremo C del polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3; y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11; y
  - 50 (d) el polipéptido de (b), en el que el extremo C del polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con SEC ID N°: 3 y en el que el polipéptido es capaz de unirse a miostatina, activina A o GDF-11.
8. Una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor de activina de tipo IIB5 en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2.
9. Una proteína aislada como se indica en la reivindicación 8, que carece de una secuencia señal de SEC ID N°: 2, específicamente los aminoácidos 1 a 17 de SEC ID N°: 2.
- 60 10. Una proteína aislada que comprende un polipéptido codificado por el polinucleótido expuesto en SEC ID N°: 1.
11. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 9 ó 10, en la que el polipéptido se fusiona a al menos un polipéptido heterólogo, opcionalmente en la que la proteína heteróloga es un polipéptido de Fc, estando el polipéptido de Fc opcionalmente unido a través de una secuencia enlazadora.
- 65 12. Una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para comprender un vector recombinante como se

indica en la reivindicación 6 que i) dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o ii) produce la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, siendo la célula hospedadora opcionalmente una célula de mamífero.

- 5 13. Un método para producir un polipéptido de receptor de activina IIB5 que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 12 que está modificada por ingeniería genética para producir la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 en condiciones que promueven la expresión del polipéptido y recuperación del polipéptido.
- 10 14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de receptor de activina de tipo IIB5 de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 en mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 15 15. Una composición farmacéutica como se indica en la reivindicación 14, para su uso en la inhibición de la actividad de miostatina en un sujeto, el aumento de la masa muscular magra en un sujeto, el aumento de la fuerza muscular magra mediante el aumento de la proporción de masa de músculo magro a grasa en un sujeto o el tratamiento de una enfermedad de pérdida de músculo en un sujeto.
- 20 16. Una composición farmacéutica como se indica en la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto o para tratar una enfermedad en la cual la activina está sobreexpresada en un sujeto.
- 25 17. La composición para su uso como se indica en la reivindicación 15 o reivindicación 16 en la que la enfermedad de pérdida de músculo se selecciona entre distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, caquexia por cáncer, SIDA, insuficiencia renal, uremia, artritis reumatoide, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia de órgano, síndrome del túnel carpiano, privación de andrógeno y pérdida de músculo debido a reposo en cama prolongado, lesión de médula espinal, apoplejía, fractura ósea y envejecimiento.
- 30 18. La composición para su uso como se indica en la reivindicación 16, en la que el trastorno metabólico se selecciona entre diabetes, obesidad, hiperglucemia y pérdida ósea.
- 35 19. El vector de la reivindicación 6, en el que el vector es capaz de dirigir la expresión de polipéptido de ActRIIB5 en un sujeto, opcionalmente en el que el vector es un vector de AAV, para su uso en el tratamiento de un trastorno de pérdida de músculo.



*Fig. 1*



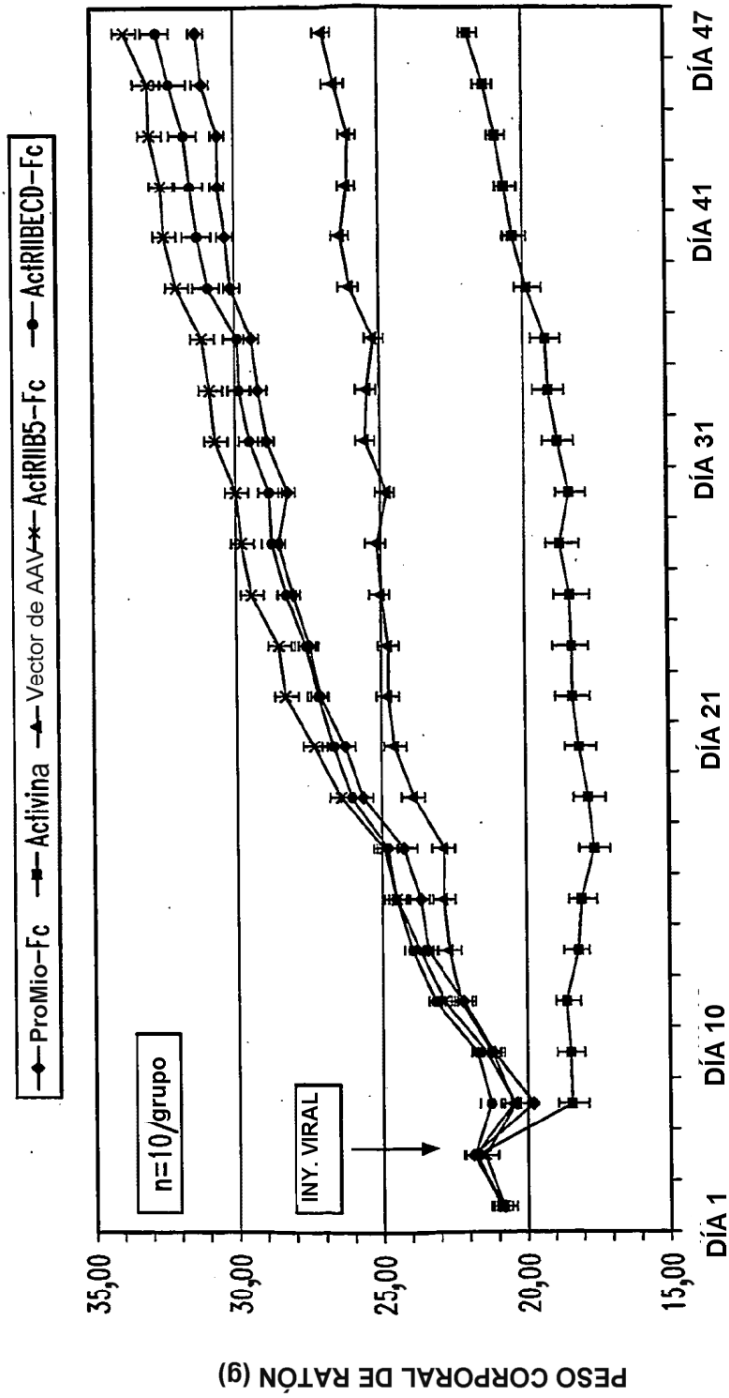
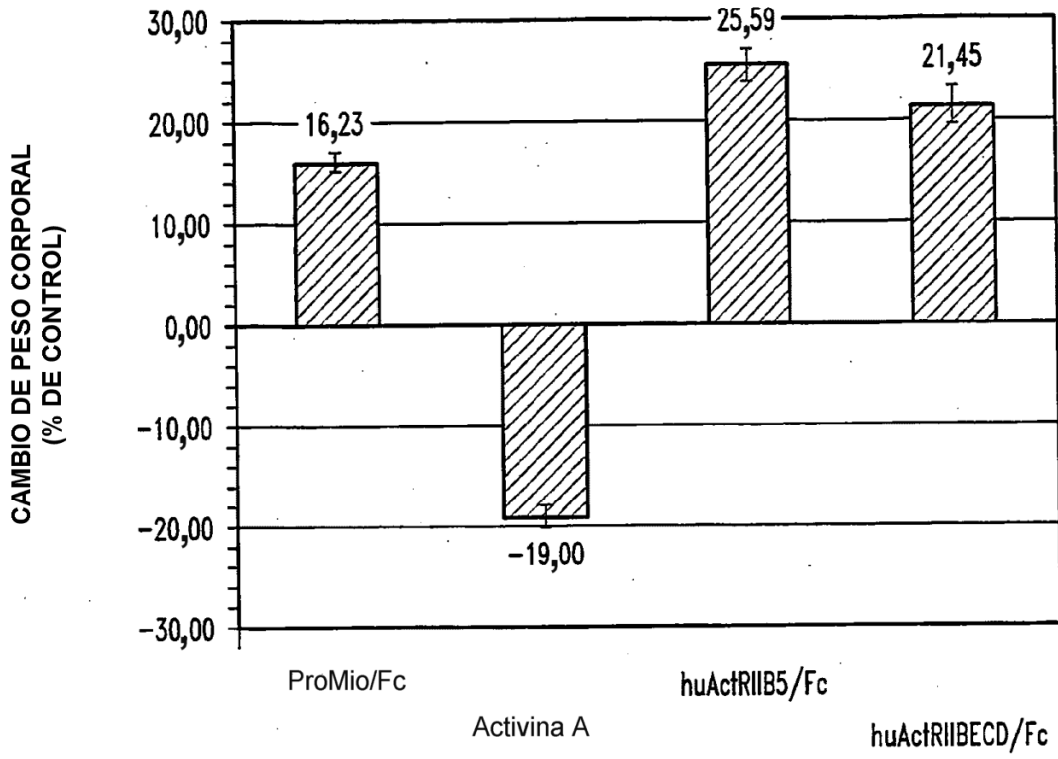
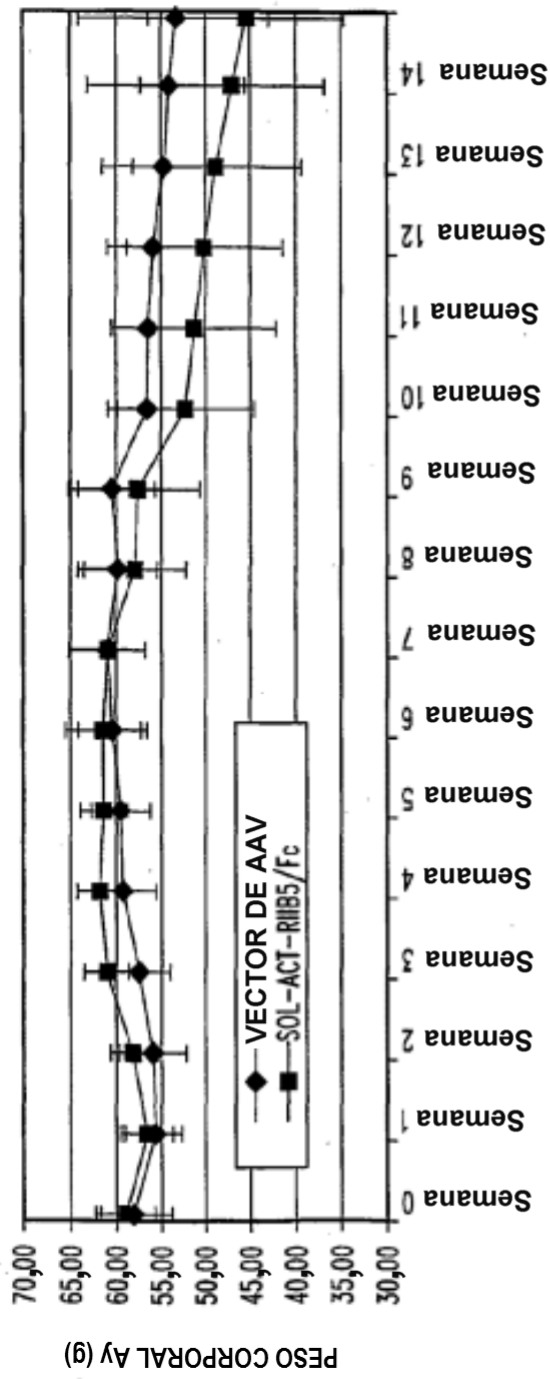


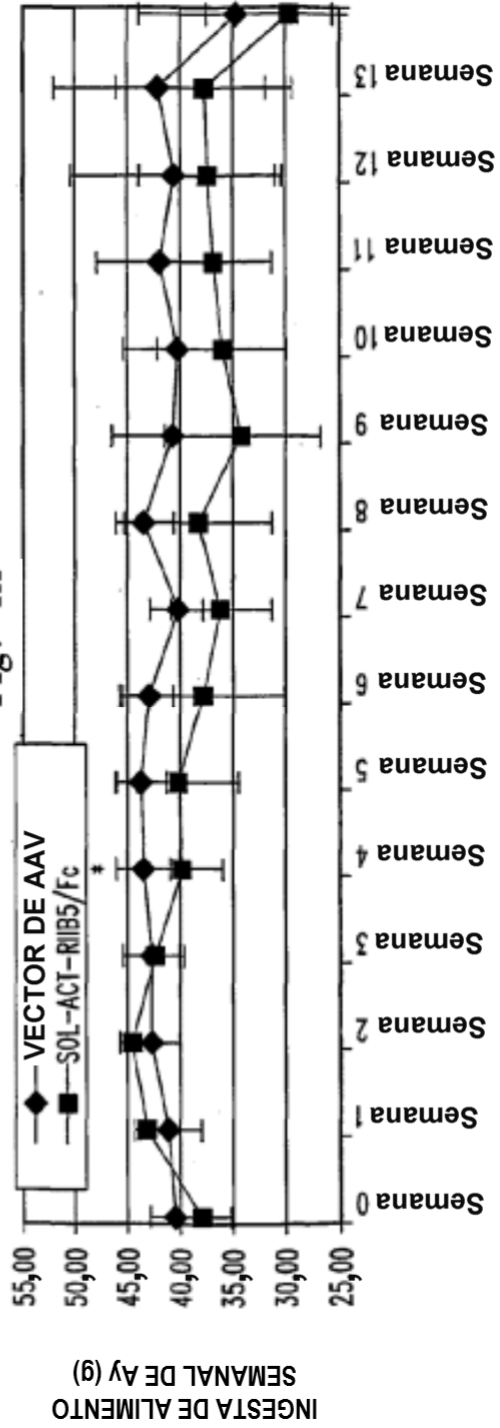
Fig. 2



*Fig. 3*



*Fig. 4A*



*Fig. 4B*

