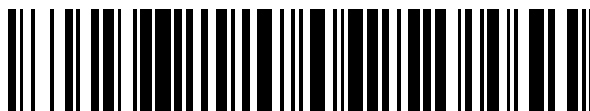


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 854**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2008** **E 13157694 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014** **EP 2607379**

54 Título: **Variantes derivadas de ActRIIB y sus usos**

30 Prioridad:

02.02.2007 US 899304 P

01.05.2007 US 927088 P

25.05.2007 US 931880 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2014

73 Titular/es:

ACCELERON PHARMA, INC. (100.0%)

128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

KNOPF, JOHN;
KUMAR, RAVINDRA y
SEEHRA, JASBIR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 488 854 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

Variantes derivadas de ActRIIB y sus usos

5 Antecedentes de la invención

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene diversos factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que esas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y en la especificación del tejido y pueden influir sobre diversos procesos de diferenciación, incluidos adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Manipulando la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piemontés y belga azul tienen una mutación de pérdida de la función en el gen GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un notable aumento de la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en humanos los alelos inactivos de GDF8 se asocian a un incremento de la masa muscular y según se dice, una fuerza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Se pueden lograr cargas en músculo, hueso, cartílago y otros tejidos agonizando o antagonizando la señalización que es mediada por un miembro apropiado de la familia TGF-beta. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes que actúen como reguladores potentes de la señalización de TGF-beta.

25 Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una variante de la proteína ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 29 a 109 de SEC. ID N°: 2, en la cual la proteína comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEC. ID N°: 2.

Las características preferidas de la variante de la proteína ActRIIB de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes de este documento.

Dichos polipéptidos ActRIIB se pueden usar para el tratamiento de diversos trastornos o afecciones, en particular, trastornos musculares y neuromusculares (por ejemplo, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y atrofia muscular), y atrofia muscular progresiva asociada a la edad (sarcopenia), terapia de cáncer de próstata y caquexia del cáncer. La invención proporciona un conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que tienen una afinidad por activina muy disminuida aunque mantienen la unión a GDF11. Estas variantes producen efectos deseables sobre el músculo reduciendo simultáneamente los efectos sobre otros tejidos.

En otro aspecto, la invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende la variante de la proteína ActRIIB de la invención. Opcionalmente, la variante de la proteína ActRIIB se une a un ligando de ActRIIB con una Kd menor de 10 micromolar o menor de 1 micromolar, 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, la variante de la proteína ActRIIB inhibe la señalización de ActRIIB, como los eventos de transducción de señal intracelular activados por un ligando de ActRIIB. Una variante de la proteína ActRIIB de la invención incluye una o más alteraciones adicionales en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión al ligando) en relación con un polipéptido ACTRIIB de origen natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIB de origen natural. Una variante de la proteína ActRIIB puede ser una proteína de fusión que tenga, como un dominio, una proteína ActRIIB y uno o más dominios adicionales que proporcionen una propiedad deseable, como mejor farmacocinética, purificación más fácil, administración dirigida a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de: la estabilidad in vivo, la vida media in vivo, la absorción/ administración, la localización o distribución en el tejido, la formación de complejos proteicos, la multimerización de la proteína de fusión y/o la purificación. Una variante de la proteína de fusión de ActRIIB puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (natural o mutante) o una seroalbúmina. En ciertas realizaciones, una fusión ActRIIB-Fc comprende un conector relativamente desestructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIB. Este conector desestructurado puede corresponder a la región desestructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente exentos de estructura secundaria. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, repeticiones TG₄ o SG₄). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, como un epítipo marcador, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB soluble incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados elegidos entre: un aminoácido glucosilado,

un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales como un compuesto que se use para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Preferentemente, una preparación farmacéutica es sustancialmente apirógena. En general, es preferible que una proteína ActRIIB se exprese en una línea celular de mamíferos que medie adecuadamente la glucosilación natural de la proteína ACTRIIB para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han utilizado con éxito las líneas celulares humana y CHO, y se espera que otros vectores de expresión de mamíferos comunes sean útiles.

En este documento se dan a conocer productos farmacéuticos envasados que comprenden la preparación farmacéutica descrita aquí y rotulada para usar en la promoción del crecimiento de un tejido o en la disminución o la prevención de la pérdida de un tejido en un humano. Los ejemplos de tejidos incluyen hueso, cartílago, músculo, grasa y tejido neuronal.

La invención proporciona variantes de las proteínas ActRIIB que comprenden un dominio de unión al ligando alterado (por ejemplo, unión a GDF8). Dichos dominios de unión al ligando alterados de un receptor ActRIIB comprenden un aminoácido ácido en la posición 79 y además pueden comprender una o más mutaciones en residuos de aminoácidos como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, D80, F82 y F101 de ActRIIB humana. (La numeración es con respecto a SEC. ID N°: 2). Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado puede tener mayor selectividad por un ligando como GDF8/GDF11 en relación con un dominio de unión al ligando natural de un receptor ActRIIB. A título ilustrativo, en este documento se demuestra que estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión al ligando alterado por GDF11 (y por lo tanto, presumiblemente, GDF8) en relación con activina (presentada con respecto a ActRIIB): K74Y, K74F, K74I y D80I. Las mutaciones siguientes tienen el efecto inverso, aumentan la relación de unión a activina en relación con GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión total (GDF11 y activina) se puede aumentar por inclusión de la región "cola" o, presumiblemente, una región conectora desestructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que causaron una disminución general en la afinidad de unión al ligando, incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se pueden combinar para obtener los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan la relación de unión a GDF11:activina tienen un efecto general negativo sobre la unión al ligando, y por lo tanto, éstas se pueden combinar con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una mejor proteína de unión con selectividad por el ligando.

Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe a GDFB/GDF11 con una CI_{50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la CI_{50} para inhibir a activina. Estos polipéptidos ActRIIB solubles pueden ser proteínas de fusión que incluya un dominio Fc de inmunoglobulina (natural o mutante). En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB solubles en cuestión son antagonistas (inhibidores) de GDFB/GDF11.

Se consideran otras variantes de ActRIIB, como las siguientes. Una variante de la proteína de fusión de ActRIIB que comprende una porción derivada de la secuencia de ActRIIB de SEC. ID N°: 2 y una segunda porción de polipéptido, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEC. ID N°: 2 (opcionalmente comienza en 22-25 de SEC. ID N°: 2) y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEC. ID N°: 2. La porción derivada de ActRIIB puede corresponder a (a) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEC. ID N°: 2 (opcionalmente comienza en 22-25 de SEC. ID N°: 2) y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEC. ID N°: 2; (b) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEC. ID N°: 2 (opcionalmente comienza en 22-25 de SEC. ID N°: 2) y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEC. ID N°: 2; (c) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEC. ID N°: 2; (d) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEC. ID N°: 2; (e) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEC. ID N°: 2; (f) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEC. ID N°: 2; (g) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEC. ID N°: 2; (h) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEC. ID N°: 2; (i) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEC. ID N°: 2; (j) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEC. ID N°: 2; (k) una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEC. ID N°: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEC. ID N°: 2. Sorprendentemente, los constructos que comienzan en 22-25 de SEC. ID N°: 2 tienen niveles de actividad mayores que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humana. Cualquiera de las variantes anteriores de la proteína de fusión de ActRIIB se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de ActRIIB anteriores puede tener una porción heteróloga que comprenda una región constante de una cadena pesada de IgG, como un dominio Fc.

Una variante de la proteína ActRIIB de la invención puede tener un R o K en la posición correspondiente a 64 de SEC. ID N°: 2. Se puede colocar al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEC. ID N°: 2 fuera del bolsillo de unión al ligando, una alteración conservadora dentro del bolsillo de unión al ligando, una alteración en una de las posiciones elegidas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55 y F82. La variante de la proteína ActRIIB puede comprender al menos una secuencia N-X-SIT en una posición diferente de una secuencia N-X-SFT endógena de ActRIIB y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando.

La variante de la proteína ActRIIB puede comprender un N en la posición correspondiente a la posición 24 de SEC. ID N°: 2 y un S o T en la posición correspondiente a la posición 26 del SEC. ID N°: 2. La variante de la proteína ActRIIB puede ser una proteína de fusión que comprenda además una porción heteróloga. Cualquiera de las variantes anteriores de las proteínas de fusión de ActRIIB se puede producir como un homodímero.

Cualquiera de las proteínas de fusión de ActRIIB anteriores puede tener una porción heteróloga que comprenda una región constante de una cadena pesada de IgG, como un dominio Fc.

En este documento se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIB soluble, que no codifican un polipéptido ActRIIB completo. Un polinucleótido aislado puede constar de una secuencia codificante de un polipéptido ActRIIB soluble, como el descrito antes. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión al ligando) de un ActRIIB y una secuencia que codificaría parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRIIB, pero de un codón de parada colocado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o colocado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia del polinucleótido ACTRIIB de longitud normal como SEC. ID N°: 4 o una versión parcialmente truncada, dicho polinucleótido aislado puede comprender además un cordón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3'-terminal o de lo contrario colocado de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIB de longitud normal. Los ácidos nucleicos dados a conocer en este documento están unidos operativamente a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferentemente la célula es una célula de mamífero como una célula CHO.

También se dan a conocer en este documento métodos para preparar un polipéptido ActRIIB soluble. Dicho método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEC. ID N°: 3) dados a conocer en este documento en una célula adecuada, como la línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIB soluble, donde dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActRIIB soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRIIB soluble así expresado. Los polipéptidos ActRIIB solubles se pueden recuperar como fracciones crudas, parcialmente purificadas o muy purificadas empleando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteínas a partir de cultivos celulares.

Se puede utilizar un polipéptido ActRIIB soluble dado a conocer en este documento en un método para tratar a un sujeto que padece un trastorno asociado a pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente. Dichos trastornos incluyen atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y un trastorno de atrofia muscular progresiva (por ejemplo, caquexia, anorexia, síndrome DMD, síndrome BMD, síndrome consuntivo por SIDA, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares, enfermedades de la neurona motora, enfermedades de la sinapsis neuromuscular y miopatías inflamatorias). Un método puede comprender la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

Se puede emplear un polipéptido ActRIIB soluble dado a conocer en este documento en un método para disminuir el contenido de grasa corporal o reducir la velocidad de aumento del contenido de grasa corporal, y para tratar un trastorno asociado con el aumento indeseable de peso corporal, como la obesidad, diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipertensión, osteoartritis, accidente cerebrovascular, problemas respiratorios y enfermedades de la vesícula biliar. Estos métodos pueden comprender administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

Se puede utilizar un polipéptido ActRIIB soluble dado a conocer en este documento en un método para tratar un trastorno asociado a una actividad anómala de GDF8. Estos trastornos incluyen enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2, deterioro de la tolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (por ej., síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por traumatismo (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia de un órgano; debilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; sarcopenia, caquexia y otros síndromes de atrofia muscular progresiva; osteoporosis; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; fracturas relacionadas con osteoporosis; baja masa ósea debida a tratamiento crónico con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura,

supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. El método puede comprender la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

5 En este documento se da a conocer un método para identificar un agente que estimule el crecimiento de un tejido como hueso, cartílago, músculo y grasa. El método comprende: a) identificar un agente de prueba que se una a un dominio de unión al ligando de un polipéptido ActRIIB, competitivamente con un polipéptido ActRIIB soluble; y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento del tejido.

10 También se dan a conocer en este documento métodos para antagonizar la actividad de un polipéptido ActRIIB o de un ligando de ActRIIB (por ejemplo, GDF8, GDF11, activina, BMP7 y Nodal) en una célula. Los métodos comprenden poner en contacto la célula con un polipéptido ActRIIB soluble. Opcionalmente, la actividad del polipéptido ActRIIB o del ligando de ActRIIB es controlada por una transducción de la señalización mediada por el complejo ActRIIB/ligando de ActRIIB, por ejemplo, mediante el control de la proliferación celular. Las células de los
15 métodos incluyen un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adiposito y una célula muscular.

También se dan a conocer usos de un polipéptido ActRIIB soluble para la elaborar un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno o afección como los descritos en este documento.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una secuencia del polipéptido ActRIIB soluble (extracelular) humano (SEC. ID N°: 1). El extremo C-terminal la "cola" está subrayado.

25 La figura 2 muestra la secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humano (SEC. ID N°: 2). El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en negrita (también denominado SEC. ID N°: 1); y los posibles sitios de glucosilación unidos por N están recuadrados.

30 La figura 3 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB soluble (extracelular) humano, designado como SEC. ID N°: 3.

La figura 4 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humano, designado como SEC. ID N°: 4.

35 La figura 5 muestra aumentos de peso corporal para ratones tratados con vehículo (diamantes), ActRIIB(R64 20-134)-mFc (cuadrados) o la forma de vida media larga, ActRIIB (R64 A24N 20-134) (triángulos).

40 La figura 6 muestra el peso de los músculos disecados al final del estudio. Vehículo: columna izquierda (sombreado ligero) de cada agrupamiento; ActRIIB(R64 20-134)-mFc: columna del medio (sombreado mediano) de cada agrupamiento; ActRIIB (R64 A24N 20-134): columna de la derecha (sombreado oscuro) de cada agrupamiento.

45 La figura 7 muestra medidas de fuerza de agarre para ratones SOD tratados con PBS y ActRIIB murina (R64 K74A 20-134)-mFc (o "K74A + 15 cola") (barras blanca y negra, respectivamente). La figura ilustra la mayor fuerza del grupo tratado con ActRIIB murina (R64 K74A 20-134)-mFc en comparación con el grupo tratado con PBS durante las etapas temprana (día 117) y tardía (día 149) de la enfermedad. * P<0.05, prueba t de Student bilateral.

50 La figura 8 muestra la comparación de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones SOD tratados con PBS y ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc en (líneas blanca y negra, respectivamente). La cohorte tratada con ActRIIB (R64 K74A 20-134)- mFc tiene mayor número promedio de días de supervivencia en comparación con el grupo del PBS.

55 La figura 9 muestra el porcentaje de cambio en la composición corporal en ratones alimentados con dieta rica en contenido de grasas (HFD) tratados con PBS y ActRIIB(R64 20-134)-mFc (barras blanca y negra, respectivamente). El tratamiento con la proteína ActRIIB murina (R64 20-134)-Fc reduce significativamente la masa de grasa y aumenta el tejido magro.

60 La figura 10 muestra un corte transversal del músculo femoral (aumento 4x) de ratones viejos (A) o ratones viejos tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc (B).

La figura 11 muestra la media de los pesos corporales para los ratones en un experimento de caquexia del cáncer utilizando células de cáncer de colon CT26. Diamantes: animales sin tumor tratados con solución salina; cuadrados: ratones sin tumor tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc; triángulos: ratones con tumor tratados

con solución salina; "x": ratones con tumor tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc (10 mg/kg; "***": ratones con tumor tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc (30 mg/kg); círculo: ratones con tumor tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc (10 mg/kg), tratamiento iniciado en el momento del implante del tumor para una modalidad preventiva.

La figura 12 muestra una alineación de ActRIIA y ActRIIB humanos con los residuos que se deducen en el presente documento, basándose en el análisis de compuestos de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para contactar directamente al ligando (el bolsillo de unión al ligando) indicado con recuadros.

La figura 13 muestra una alineación múltiple de secuencias de proteínas ActRIIB de varios vertebrados y ActRIIA humana.

Descripción detallada

1. Visión general

La presente invención se refiere en general a los polipéptidos ActRIIB. Según se usa en este documento, el término "ActRIIB" se refiere a la familia de las proteínas que son receptores de activina tipo IIB (ActRIIB) y las proteínas relacionadas con ActRIIB derivadas de cualquier especie. Los miembros de la familia de ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad prevista de serina/treonina cinasa. Las secuencias de aminoácidos de la proteína precursora de ActRIIA humano (proporcionada para comparación) y la proteína precursora de ActRIIB se ilustran en la figura 1 (SEC. ID N°: 1) y la figura 2 (SEC. ID N°: 2), respectivamente.

La expresión "polipéptido ActRIIB" se usa para referirse a polipéptidos que consisten en cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia de ActRIIB, así como sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que mantengan una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier *ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB y preferentemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más de identidad.

En una realización específica, la invención se refiere a ciertos polipéptidos ActRIIB solubles. Según se describe en este documento, la expresión "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que consisten en un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. La expresión "polipéptido ActRIIB soluble" según se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIB, así como cualquiera de sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que mantenga una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y es generalmente soluble. Ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles incluyen los polipéptidos ActRIIB solubles ilustrados en la figura 1 (SEC. ID N°: 1). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia de señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, véase Ejemplo 1. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal nativa de un ActRIIB, o una secuencia de señal de otra proteína, como una secuencia de señal del activador del plasminógeno tisular (TPA) o una secuencia de señal de melitina de miel de abeja (HBM).

Las señales de TGF- β son mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa tipo I y tipo II, los cuales fosforilan y activan en dirección 3' las proteínas Smad luego de la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad prevista de serina/treonina. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores tipo II son necesarios para unir ligandos y para la expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina tipo I y II forman un complejo estable luego de la unión al ligando, que da lugar a la fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

Se identificaron dos receptores tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como receptores tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interaccionar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , como BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y (McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). Los solicitantes encontraron que las proteínas de fusión ActRIIA-Fc solubles y las proteínas de fusión ActRIIB-Fc tienen efectos sustancialmente diferentes in vivo, donde ActRIIA-Fc tiene efectos principalmente sobre el hueso y ActRIIB-Fc tiene efectos principalmente sobre el músculo esquelético.

Los polipéptidos ActRIIB se pueden utilizar para antagonizar un ligando de los receptores ActRIIB (también denominado un ligando de ActRIIB). Por lo tanto, dichos polipéptidos son útiles para tratar trastornos asociados a

una actividad anómala de uno o más ligandos de los receptores ActRIIB. Los ejemplos de ligandos de los receptores ActRIIB incluyen algunos de los miembros de la familia de TGF- β como activina, Nodal, GDF8, GDF11; y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento, polipéptidos diméricos, y pertenecen a la familia de TGF-beta. Existen tres activinas (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$). En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción hormonal en células de ovarios y de placenta, ayudan a la supervivencia celular neuronal, influyen positivamente o negativamente en el progreso del ciclo celular dependiendo del tipo de célula e inducen la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med.198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Además, el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de las células de leucemia monocítica humanas estimuladas resultó ser idéntico a activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se sugirió que la activina A actúa como un regulador natural de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) desde la hipófisis, la activina promueve la secreción y la síntesis de FSH, mientras la inhibina evita la secreción y la síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada con folistatina (FSRP), la α_2 -macroglobulina, Cerberus y endogлина, que se describen a continuación.

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y endodermo, así como en la organización posterior de estructuras axiales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se demostró que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la notocorda y la placa precordial mientras recluta las células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar tanto a través de los receptores tipo I como tipo II y los efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes respaldan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores tipo II para Nodal (Sakuma et al., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Se sugiere que los ligandos de Nodal interactúan con sus cofactores (por ej., cripto) para activar los receptores de activina tipo I y tipo II, que fosforilan a Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos eventos fundamentales para el embrión de vertebrado temprano, como la formación del mesodermo, la formación del patrón anterior y la especificación del eje de izquierda a derecha. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización de Nodal activa a pAR3-Lux, una luciferasa reportero de que se demostró previamente que responde específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir a pTlx2-Lux, un reportero especialmente sensible a las proteínas morfogenéticas del hueso. Los resultados recientes proporcionan una evidencia bioquímica directa de que la señalización de Nodal es mediada por ambas Smad de la vía activina-TGF-beta, Smad2 y Smad3. Evidencia posterior ha demostrado que la proteína cripto extracelular es necesaria para la señalización de Nodal, lo que la diferencia de la señalización de activina o de TGF-beta.

El factor de crecimiento y diferenciación -8 (GDF8) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa del músculo esquelético. GDF8 se expresa en gran medida en el músculo esquelético adulto y en desarrollo. La mutación anuladora GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron et al., Nature, 1997, 387:83-90). Aumentos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones de origen natural de GDF8 en el ganado (Ashmore et al., 1974, Growth, 38:501-507; Swatland y Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; y Kambadur et al., Genome Res., 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en los seres humanos (Schuelke et al., N Engl J Med 2004;350:2682-8). Los estudios también han demostrado que la atrofia muscular progresiva asociada a infecciones por el VIH en los seres humanos es acompañada por el aumento de la expresión de la proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS, 1998, 95:14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ej., creatina cinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos (WO 00/43781). El péptido GDF8 se puede unir no covalentemente al dímero del dominio de GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263:6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; y Brown et al. (1990) Growth Factors, 3:35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o proteínas estructuralmente relacionadas e inhiben su actividad biológica, incluyen folistatina y potencialmente proteínas relacionadas con folistatina (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208:222-232).

El factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22:260-264). GDF11 se expresa en el esbozo de cola, el esbozo de miembro y los arcos maxilares y mandibulares y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80:185-189). GDF11 desempeña un papel único en la formación del patrón tanto de tejidos mesodérmico como neural (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208:222-32). GDF11 demostró ser un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo del miembro del polluelo (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229:407-20). La expresión de GDF11 en el músculo también sugiere un papel en la regulación del crecimiento muscular en forma similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se encontró que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfatorio (Wu et al., 2003, Neuron. 37:197-207). Por lo tanto, GDF11

pueden tener aplicaciones in vitro e in vivo en el tratamiento de enfermedades como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ej., esclerosis lateral amiotrófica).

La proteína morfogenética ósea (BMP7), también denominada proteína osteogénica 1 (OP-1), se sabe que induce la formación de cartílago y hueso. Además, BMP7 regula una amplia gama de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 puede ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se encontró que BMP7 desempeña un papel en la regulación del calcio y la homeostasis ósea. Como la activina, BMP7 se une a los receptores tipo II, ActRIIA y IIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan distintos receptores de tipo I en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor tipo I de BMP7 observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina provocaron distintas respuestas biológicas y activaron diferentes vías de Smad (Macias-Silva et al., 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

Ciertos polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) se pueden utilizar para antagonizar la señalización de ligandos de ActRIIB en general, en todos los procesos asociados a la actividad de ActRIIB. Opcionalmente, los polipéptidos ActRIIB pueden antagonizar uno o más ligandos de los receptores ActRIIB como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7 y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales.

Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB se pueden utilizar en el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones que se asocian a actividad anómala de un ActRIIB o un ligando de ActRIIB. ActRIIB o los ligando de ActRIIB están implicados en la regulación de muchos procesos biológicos fundamentales. Debido a sus funciones clave en estos procesos, pueden ser objetivos deseables para la intervención terapéutica. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) se pueden usar para tratar trastornos o afecciones de humanos o de animales. Los ejemplos de dichos trastornos o afecciones incluyen, pero no exclusivamente, trastornos metabólicos como diabetes tipo 2, deterioro de la tolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (por ej., síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por traumatismo (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); trastornos musculares y neuromusculares como distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia de un órgano; debilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de atrofia muscular progresiva. Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en las mujeres ancianas y/o posmenopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; y fracturas relacionadas con osteoporosis. Aún otros ejemplos incluyen baja masa ósea debida al tratamiento crónico con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Estos trastornos y afecciones se tratan más adelante en la sección "Ejemplos de usos terapéuticos".

Los términos utilizados en esta memoria tienen en general los significados corrientes en el área, en el contexto de esta invención y en el contexto específico en el que cada término es utilizado. Algunos términos se discuten a continuación o en otra parte de la memoria, para proporcionar orientación adicional al practicante en la descripción de las composiciones y los métodos de la invención y en cómo prepararlas y utilizarlas. El alcance o el significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se utiliza el mismo.

"Alrededor de" y "aproximadamente" significarán en general un grado aceptable de error para la cantidad medida, dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Habitualmente, los ejemplos de grados de error suelen estar dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10% y más preferentemente dentro del 5% de un determinado valor o rango de valores.

Alternativamente y, en particular en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores medios que están en un entorno de un orden de magnitud, preferentemente en un entorno de 5 veces y más preferentemente en un entorno de 2 veces un determinado valor. Las cantidades numéricas indicadas en este documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que las expresiones "alrededor de" o "aproximadamente" se pueden inferir cuando no hayan sido expresamente indicadas.

Los métodos dados a conocer pueden incluir pasos de comparación de secuencias entre sí, inclusive la secuencia natural con uno o más mutantes (variantes de la secuencia). Dichas comparaciones comprenden habitualmente alineaciones de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en el área (como BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, cuando una mutación contiene una inserción o delección de un residuo, la alineación de secuencias introducirá un "hueco" (gap) (normalmente representado por un guion, o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

"Homóloga", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común," incluidas las proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como las proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Dichas proteínas (y los ácidos nucleicos que las codifican) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos

de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

La expresión "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, alude al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

Sin embargo, en el uso común y en esta solicitud, el término "homóloga", cuando es modificado con un adverbio, como "sumamente", puede referirse a la similitud de secuencias, y puede referirse o no, a un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos ActRIIB

En este documento se dan a conocer variantes de los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles). Opcionalmente, los fragmentos, las variantes funcionales y las formas modificadas tienen las mismas, o similares, actividades biológicas que sus correspondientes polipéptidos ActRIIB naturales. Por ejemplo, una variante de ActRIIB de la invención se puede unir a, e inhibir la función de, un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB modula el crecimiento de tejidos como hueso, cartílago, músculo o grasa. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen el polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEC. ID N°: 2) y polipéptidos ActRIIB solubles humanos (p. ej., SEC. ID N°: 1, 5, 6 y 12).

La divulgación identifica porciones funcionalmente activas y variantes de ActRIIB. Los solicitantes han determinado con precisión que una proteína de fusión de Fc que tiene la secuencia dada a conocer por Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15; 83(8):2163-70), que tiene una Alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de SEC. ID N°: 2 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. Por el contrario, la misma proteína de fusión de Fc con una Arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y GDF-11 en el rango que va de nanomolar bajo a picomolar alto. Por lo tanto, una secuencia con una R64 se utiliza como secuencia de referencia natural para ActRIIB humana en esta divulgación.

Attisano et al. (Cell. 10 de enero de 1992; 68(1):97-108) mostraron que una delección en el nudo de prolina en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor por la activina. Los datos presentados en este documento muestran que una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de SEC. ID N°: 2, "ActRIIB(20-119)-Fc" redujo la unión a GDF-11 y activina en relación con una ActRIIB(20-134)-Fc, que incluye la región del nudo de prolina y el dominio yuxtamembrana completo. Sin embargo, una proteína ActRIIB(20-129)-Fc mantiene una actividad similar pero algo reducida en relación con la natural, aunque la región del nudo de prolina esté interrumpida. Por lo tanto, se espera que los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 sean todos activos, pero los constructos que se detienen en 134 o 133 pueden ser los más activos. Del mismo modo, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por grandes márgenes. En apoyo a esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por consiguiente, una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan menor unión al ligando. El aminoácido 119 está poco conservado y por lo tanto es fácilmente alterado o truncado. Las formas que terminan en 128 o después mantienen la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Puede ser deseable usar cualquiera de esas formas, dependiendo del escenario clínico o experimental.

En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes mantenga la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparragina en la posición 24 introduce una secuencia de glucosilación unida por N sin afectar sustancialmente la unión al ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión de señal y la región entrecruzada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29 son bien toleradas. En particular, los constructos que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 mantendrán la actividad y los constructos que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 también se espera que mantengan la actividad. Los datos que se muestran en los ejemplos demuestran que sorprendentemente, un constructo que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de SEC. ID N°: 2 y los constructos pueden comenzar, por ejemplo, en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición entre 20-29 o 21-29 y terminan en una posición entre 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición entre 20-24 o (21-24 o 22-25) y terminan en una posición entre 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133). También se contemplan las variantes dentro de estos rangos, particularmente las que tienen al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la porción correspondiente de SEC. ID N°: 2.

La divulgación incluye los resultados de un análisis de composición de las estructuras de ActRIIB, que se muestra en la figura 13, que demuestra que el bolsillo de unión al ligando está definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 hasta T41, E47, E50, Q53 hasta K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 hasta N83, Y85, R87, A92 y E94 hasta F101. Se espera que en estas posiciones, las mutaciones conservadoras sean bien toleradas, aunque una mutación K74A es bien tolerada, como lo son R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán los aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es R en ActRIIB bovina y K en ActRIIB de *Xenopus*, y por lo tanto los aminoácidos incluidos R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para una variante de la proteína ActRIIB activa es la que comprende los aminoácidos 29-109, pero opcionalmente comienza en una posición que varía entre 20-24 o 22-25 y termina en una posición que varía entre 129-134, y comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión al ligando. Tal proteína puede mantener más de 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEC. ID N°: 2. Los sitios fuera del bolsillo de unión al ligando, en el cual la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se señaló antes) y las posiciones 42-46 y 65-73. Un cambio de asparragina a alanina en la posición 65 (N65A) mejora en realidad la unión al ligando en A64 de origen y por lo tanto se espera que no tenga ningún efecto perjudicial sobre la unión al ligando en R64 de origen. Este cambio elimina probablemente la glucosilación en N65 y en A64 de origen, lo que demuestra por lo tanto que un cambio significativo en esta región es probable que sea tolerado. Si bien un cambio R64A es mal tolerado, R64K es bien tolerado, y por lo tanto otro residuo básico, como H puede ser tolerado en la posición 64.

ActRIIB está bien conservado a través de casi todos los vertebrados, con grandes extensiones del dominio extracelular conservadas totalmente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB están también muy conservados. En consecuencia, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan una buena comprensión de los residuos que pueden ser alterados. Por consiguiente, una variante de ActRIIB humana activa, puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de ActRIIB de otro vertebrado, o puede incluir un residuo que sea similar al de la secuencia humana o de otro vertebrado. Los ejemplos siguientes ilustran este enfoque para definir una variante de ActRIIB activa. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus*, y por lo tanto esta posición se puede alterar y opcionalmente se puede cambiar a otro residuo hidrófobo, como V, I o F, o un residuo no polar como A. E52 es una K en *Xenopus*, lo que indica que este sitio puede ser tolerante con una gran variedad de cambios, incluidos los residuos polares, como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, con residuos polares favorecidos, como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es Y en *Xenopus* y por lo tanto Y u otro grupo hidrófobo, como I, V o L debería ser tolerado. E111 es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, inclusive D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos básicos son tolerados en esta posición, inclusive R y H. A en la posición 119 está relativamente mal conservada y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, por lo tanto esencialmente cualquier aminoácido debería ser tolerado en esta posición.

La divulgación demuestra que la adición de otro sitio de glucosilación unido por N (N-X-S/T) incrementa la vida media sérica de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB (R64)-Fc. Introduciendo una asparragina en la posición 24 (construido A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una vida media más larga. Se encuentran otras secuencias de NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no ser eficazmente glucosilada con R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T se pueden introducir generalmente en las posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definidas en la figura 12. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de las secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el conector entre la secuencia de ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Tal sitio se puede introducir con mínimo esfuerzo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistentes, o introduciendo un S o T en la posición correspondiente a un N preexistente. Por lo tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glucosilación unido por N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se prevé que sea glucosilado puede ser cambiado a un T sin crear un sitio inmunógeno, debido a la protección conferida por la glucosilación. Asimismo, cualquier T que se prevé que sea glucosilado se puede cambiar a un S. Por lo tanto se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Asimismo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. En consecuencia, una variante de ActRIIB puede incluir una o más secuencias de consenso de glucosilación unida por N, no endógenas.

La posición L79 se puede alterar para conferir propiedades de unión a activina - miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reducen la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D mantienen la unión a GDF-11. Notablemente, las variantes L79E y L79D de acuerdo con la invención redujeron considerablemente la unión a activina. Los experimentos in vivo indican que estos receptores que no son de activina mantienen una capacidad significativa de aumentar la masa muscular pero muestran menores efectos sobre otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y la viabilidad de obtener polipéptidos con efectos reducidos en la activina.

Las variaciones descritas se pueden combinar de diversas maneras. Además, los resultados del programa de mutagénesis descrito indican que existen posiciones de aminoácidos en ActRIIB que a menudo es beneficioso conservar. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo y particularmente triptófano), la posición 37 (ácido y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por lo tanto, en cada una de las variantes dadas a conocer en este documento, la divulgación proporciona un marco de aminoácidos que pueden ser conservados. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

Se pueden obtener fragmentos aislados de los polipéptidos ActRIIB cribando polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ej., SEC. ID N°: 3 y 4). Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente utilizando técnicas conocidas en el área como la técnica en fase sólida de Merrifield o técnicas químicas f-Moc o t-Boc convencionales. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o por síntesis química) y probar para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden actuar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o de un ligando de ActRIIB.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla elaborar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRIIB para fines como mejorar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ej., la vida útil ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Los polipéptidos ActRIIB modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son los que tendrán lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB da como resultado un homólogo funcional evaluando la capacidad de la variante del polipéptido ActRIIB para producir una respuesta en las células de una manera similar al polipéptido ActRIIB natural, o para unirse a uno o más ligandos, como activina, GDF-11 o miostatina de manera similar al natural.

En ciertas realizaciones específicas, la presente invención contempla crear mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión al ligando) de un polipéptido ActRIIB de modo que la variante (o mutante) del polipéptido ActRIIB tenga actividades de unión al ligando alteradas (por ej., afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, dichas variantes de los polipéptidos ActRIIB tienen la afinidad de unión por un ligando específico alterada (elevada o reducida). En otros casos, la variante de los polipéptidos ActRIIB tienen la especificidad de unión por sus ligandos alterada.

Por ejemplo, la divulgación proporciona variantes de los polipéptidos ActRIIB que se unen preferentemente a GDF8/GDF11 en relación con las activinas. La divulgación establece además la conveniencia de dichos polipéptidos para reducir los efectos fuera del objetivo, aunque dichas variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves donde pueden ser necesarios aumentos de masa muscular muy grandes para lograr el efecto terapéutico y donde algún nivel de efecto fuera del objetivo es aceptable. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, están en el bolsillo de unión al ligando y median la unión a sus ligandos como activina y GDF8. Por lo tanto, un dominio de unión al ligando alterado (por ej., dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIB, puede comprender una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado puede tener mayor selectividad por un ligando como GDF8 en relación con un dominio de unión al ligando natural de un receptor ActRIIB. A título ilustrativo, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión al ligando alterado por GDF8 respecto a activina. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una relación entre K_d para la unión a activina y K_d para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces más grande que la relación para el dominio de unión al ligando natural. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una relación entre CI_{50} para inhibir a activina y CI_{50} para inhibir a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor respecto al dominio de unión al ligando natural. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe a GDF8 con una CI_{50} al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menor que la CI_{50} para inhibir a activina.

Como ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión al ligando de ActRIIB se puede mutar a un residuo de aminoácido diferente de modo que la variante del polipéptido ActRIIB se una preferencialmente a GDF8, pero no a activina. Preferentemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido elegido del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido sin carga, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. De acuerdo con la invención, el residuo hidrófobo, L79, se puede cambiar a los aminoácidos ácidos, ácido aspártico o ácido glutámico, para reducir considerablemente la unión a activina manteniendo la unión a GDF11. Como reconocerá un experto en el área, la mayoría de las

mutaciones, variantes o modificaciones descritas se pueden hacer a nivel de los ácidos nucleicos o, en algunos casos, por modificación postraducciona l o por síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en el área.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIB con el fin de alterar la glucosilación del polipéptido. Los ejemplos de sitios de glucosilación en los polipéptidos ActRIIB se ilustran en la figura 2. Dichas mutaciones se pueden elegir con el fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, como sitios de glucosilación unidos por O o por N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unidos a asparragina comprenden generalmente una secuencia de tres péptidos, asparragina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por las enzimas de glucosilación celular adecuadas. La alteración también se puede hacer mediante adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIB natural (para sitios de glucosilación unidos por O). Diversas sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas posiciones del primer o tercer aminoácido de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) se traduce en no-glucosilación en la secuencia del tripéptido modificado. Otra manera de aumentar el número de porciones carbohidrato en un polipéptido ActRIIB es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRIIB. Según el modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrido libres como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos como fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La eliminación de una o más porciones carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIB se puede hacer química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIB al ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química es descrita además por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de porciones carbohidrato en los polipéptidos ActRIIB se puede lograr mediante el uso de diversas endo - y exo-glucosidasas como describen Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIB se puede ajustar, según corresponda, en función del tipo de sistema de expresión utilizado, puesto que los mamíferos, las levaduras, los insectos y las células vegetales todos pueden introducir patrones de glucosilación diferentes que pueden ser afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para usar en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporcione una glucosilación adecuada, como líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamíferos sean también útiles.

Esta divulgación contempla además un método para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido ActRIIB, incluidas, opcionalmente, variantes de truncamiento; las mezclas de mutantes combinatorias son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito del cribado de dichas bibliotecas combinatorias puede ser, por ejemplo, generar variantes del polipéptido ActRIIB que tengan propiedades alteradas, como farmacocinética alterada o unión al ligando alterada. A continuación se proporcionan diversos ensayos de cribado, y dichos ensayos se pueden usar para evaluar variantes. Por ejemplo, también se puede analizar la capacidad de una variante de un polipéptido ActRIIB para unirse a un polipéptido ActRIIB, para evitar la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB.

La actividad de un polipéptido ActRIIB o de sus variantes también se puede probar en un ensayo in vivo o a base de células. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido ActRIIB sobre la expresión de genes involucrados en la producción de hueso en un osteoblasto o precursor. Este se puede realizar, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas ligando de ActRIIB recombinantes (por ejemplo, BMP7), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido ActRIIB y/o sus variantes, y opcionalmente un ligando de ActRIIB. Asimismo, se puede administrar a un ratón u otro animal un polipéptido ActRIIB, y se pueden evaluar una o más propiedades óseas, como densidad o volumen. También se puede evaluar la velocidad de consolidación de las fracturas óseas. De manera similar, se puede analizar la actividad de un polipéptido ActRIIB o de sus variantes sobre las células musculares, los adipocitos y las células neuronales para determinar cualquier efecto sobre el crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los ensayos que se describen más adelante. Dichos ensayos son bien conocidos y de rutina en el área. Se puede utilizar un gen reportero sensible a SMAD en estas líneas celulares para monitorear los efectos sobre la señalización en dirección 3'.

Se pueden generar variantes derivadas combinatoriamente que tengan una potencia selectiva en relación con un polipéptido ActRIIB de origen natural. Dichas proteínas variantes, cuando se expresan de constructos de ADN recombinantes, se pueden utilizar en protocolos de genoterapia. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan vidas medias intracelulares drásticamente diferentes de la correspondiente a un polipéptido ActRIIB natural. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que resultan en la destrucción, o de lo contrario la inactivación, de un polipéptido ActRIIB nativo. Dichas variantes y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido ActRIIB modulando la vida media de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una vida media corta

puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando es parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRIIB recombinante dentro de la célula.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB de la invención pueden comprender además modificaciones postraduccionales aparte de todas las que están naturalmente presentes en los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no exclusivamente, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos no aminoacídicos, como polietilenglicoles, lípidos, poli o mono sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB pueden ser analizados como se describe en este documento para otras variantes del polipéptido ActRIIB. Cuando se produce un polipéptido ActRIIB en las células por escisión de una forma incipiente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegado y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden elegir de modo de garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIB.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no exclusivamente, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ej., Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. Se puede elegir un dominio de fusión con el fin de conferirle una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el propósito de purificación por afinidad, se usan matrices pertinentes para cromatografía por afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con contrapartes de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede elegir un dominio de fusión con el fin de facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIB. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP) así como "epítomos marcadores" que son secuencias de péptidos generalmente cortas para las cuales hay un anticuerpo específico disponible. Epítomos marcadores bien conocidos para los cuales hay anticuerpos monoclonales específicos fácilmente obtenibles incluyen los marcadores FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, como para el factor Xa o trombina, el cual permite a la proteasa pertinente digerir parcialmente las proteínas de fusión y de esa manera liberar de allí las proteínas recombinantes. Las proteínas liberadas se pueden aislar después del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza al polipéptido ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizador"). Mediante "estabilizar" se quiere dar a entender cualquier cosa que aumente la vida media sérica, independientemente de si se debe a una menor destrucción, a una menor depuración por el riñón o a otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominio funcionales (que confieren una función biológica adicional, como una estimulación adicional del crecimiento muscular).

Un ejemplo específico, dado a conocer en este documento es una proteína de fusión como un antagonista de GDF8 que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, de unión a GDF8) fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEC. ID N°: 13).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFKNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFPLY
SLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

Preferentemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene menor capacidad de unirse a los receptores Fcγ en comparación con un dominio Fc natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene mayor capacidad de unirse al receptor Fc relacionado a la clase I de MHC (FcRN) en comparación con un dominio Fc natural.

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden organizar de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede estar colocado C-terminal

con respecto a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede estar colocado C-terminal con respecto a un polipéptido ActRIIB. El dominio del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y puede haber otros dominio o secuencias de aminoácidos C- o N-terminales con respecto a cada dominio o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB de la presente invención contienen una o más modificaciones de son capaces de estabilizar a los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la vida media in vitro de los polipéptidos ActRIIB, aumentan la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones estabilizantes incluyen, pero no exclusivamente, proteínas de fusión (entre otras, por ejemplo, las proteínas de fusión que contienen un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluida, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRIIB) y modificaciones de la porción carbohidrato (como, por ejemplo, la eliminación de porciones carbohidrato de un polipéptido ActRIIB). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB está fusionado a un dominio estabilizador como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Según se usa en este documento, la expresión "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (por ej., Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas como una porción carbohidrato, o polímero no proteico, como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, la presente invención torna disponibles formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIB, que están aisladas, o de lo contrario sustancialmente exentas, de otras proteínas.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB (sin modificar o modificados) de la invención se pueden producir mediante diversas técnicas conocidas en el área. Por ejemplo, dichos polipéptidos ActRIIB se pueden sintetizar usando técnicas químicas estándar de proteínas como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, se dispone comercialmente de sintetizadores de péptidos automáticos (por ej., Advanced ChemTech modelo 396; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, los polipéptidos ActRIIB, sus fragmentos o variantes se pueden producir recombinantemente utilizando diversos sistemas de expresión (por ej., E. coli, células de ovario de hámster chino, células COS, baculovirus) como es bien sabido en el área (véase más adelante). En otra realización, los polipéptidos ActRIIB modificados o sin modificar se pueden producir por digestión de polipéptidos ActRIIB de longitud normal de origen natural o producidos por recombinación usando, por ejemplo, una proteasa, por ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima convertidora de aminoácidos básicos apareados (PACE). Se puede utilizar un análisis computacional (con un software comercial, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar los sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, esos polipéptidos ActRIIB se pueden producir a partir de polipéptidos ActRIIB de longitud normal de origen natural o por recombinación por técnicas estándar conocidas en el área, como escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos ActRIIB

En este documento se dan a conocer ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIB (por ej., polipéptidos ActRIIB solubles), incluida cualquiera de las variantes dadas a conocer. Por ejemplo, SEC. ID N°: 4 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB de origen natural mientras SEQ ID N°: 3 codifica un polipéptido ActRIIB soluble. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Esos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ej., en genoterapia).

Los ácidos nucleicos en cuestión que codifican los polipéptidos ActRIIB se entiende además que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEC. ID N°: 3. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, como las variantes alélicas; y, por lo tanto, incluyen secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante designada en SEC. ID N°: 4.

Se dan a conocer secuencias aisladas o recombinantes de ácidos nucleicos que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEC. ID N°: 3. Un experto comprenderá que también se divulgan las secuencias de ácidos nucleicos complementarias de SEC. ID N° 3, y las variantes de SEC. ID N° 3. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o estar en una genoteca.

Otros ácidos nucleicos también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en SEC. ID N°: 3, la secuencia complementaria de SEC. ID N°: 3, o sus fragmentos. Como se mencionó antes, un experto comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones rigurosas adecuada que promueven la hibridación del ADN. Un experto comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones rigurosas adecuadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se podría realizar la

hibridación en 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2.0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado se puede elegir desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2.0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0.2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura del paso de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65 °C. Se pueden variar la temperatura y la sal, o se puede mantener constante la temperatura o la concentración de sal mientras se cambia la otra variable. Se dan a conocer ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

También se dan a conocer ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos indicados en SEC. ID N°: 3 debido a degeneración en el código genético. Por ejemplo, un número de aminoácidos es designado por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden causar mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión existan en células de mamíferos. Un experto comprenderá que esas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta alrededor de 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Se dan a conocer cualquiera y todas esas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes.

Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden unir operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán en general adecuadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen en el área numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para diversas células huésped. Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no exclusivamente, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Se contemplan los promotores constitutivos o inducibles conocidos en el área. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Puede haber un constructo de expresión presente en una célula en un episoma, como un plásmido, o el constructo de expresión se puede insertar en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en el área y pueden variar según la célula huésped utilizada.

El ácido nucleico en cuestión se puede proporcionar en un vector de expresión que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido ActRIIB y unida operablemente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en el área y se seleccionan para dirigir la expresión de un polipéptido ActRIIB. En consecuencia, la expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen ejemplos de secuencias reguladoras en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquier secuencia de control de la expresión de una amplia variedad, que controle la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella en esos vectores para expresar las secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Dichas secuencias de control de la expresión útiles, incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor inmediato temprano del adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la T7 ARN polimerasa, las principales regiones promotora y operadora del fago lambda, las regiones de control de la proteína de la envoltura de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura, el promotor del poliedro del sistema del baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de éstos. Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Por otra parte, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como marcadores antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante ligando el gen clonado, o una porción de éste, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas o células eucariotas (levaduras, aves, insectos o mamíferos) o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en las bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en las células

eucariotas. Los vectores derivados pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo o pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de esos vectores son modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a los fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, se pueden usar derivados de virus como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o el virus Epstein - Barr (pHEBo, derivados de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión viral (incluida retroviral) se pueden encontrar más adelante en la descripción de los sistemas de administración de genoterapia. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huéspedes son bien conocidos en el área. Por otros sistemas de expresión adecuados de células procariotas y eucariotas, así como por procedimientos generales de recombinación, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser conveniente expresar polipéptidos recombinantes mediante el uso del sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcJW (como pAcJW1) y vectores derivados de pBlueBac (como los pBlueBac III que contienen β -gal).

Un vector se diseñará preferentemente para la producción de los polipéptidos ActRIIB en células CHO; como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Como resultará evidente, los constructos génicos en cuestión se pueden utilizar para causar la expresión de los polipéptidos ActRIIB en células propagadas en cultivo, por ej., para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o variantes de proteínas, para purificación.

Se da a conocer una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye la secuencia codificante (por ej., SEC. ID N°: 4) para uno o más de los polipéptidos ActRIIB en cuestión. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB de la invención se puede expresar en células bacterianas, como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, mediante un sistema de expresión de baculovirus), levaduras, o células de mamíferos. Los expertos conocen otras células huésped adecuadas.

En consecuencia, en este documento se dan a conocer métodos de producción de los polipéptidos ActRIIB en cuestión. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB se puede cultivar en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contenga el polipéptido ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB se puede retener citoplasmáticamente o en una fracción de la membrana y recolectar y lisar las células, y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en el área. Los polipéptidos ActRIIB se pueden aislar del medio de cultivo celular, de las células huésped, o de ambos, utilizando técnicas conocidas en el área para la purificación de proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de los polipéptidos ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede ser una proteína de fusión que contenga un dominio que facilite su purificación.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, como una secuencia de sitio de escisión poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina metálica de Ni^{2+} . A continuación se puede eliminar la secuencia líder de purificación por tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIB purificado (por ej., véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican secuencias de polipéptidos diferentes se realiza según las técnicas convencionales, empleando extremos romos o irregulares para el ligamiento, la digestión con enzima de restricción para proporcionar extremos adecuados, el relleno de extremos cohesivos según sea adecuado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y el ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales que incluyen los sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos del gen se puede llevar a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos consecutivos del gen que posteriormente se pueden aparear para generar una secuencia de genes química (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Anticuerpos

En este documento también se dan a conocer anticuerpos. Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIB (por ej., un polipéptido ActRIIB soluble) y que se une competitivamente con el polipéptido

ActRIIB se puede utilizar como antagonista de las actividades del polipéptido ActRIIB. Por ejemplo, mediante el uso de inmunógenos se pueden preparar derivados de un polipéptido ActRIIB, antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales, utilizando protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Se puede inmunizar un mamífero, como un ratón, un hámster o un conejo con una forma inmunógena del polipéptido ActRIIB, un fragmento antigénico que sea capaz de provocar una respuesta del anticuerpo, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenia a una proteína o un péptido incluyen la conjugación a portadores u otras técnicas conocidas en el área. Se puede administrar una porción inmunógena de un polipéptido ActRIIB en presencia de un adyuvante. El progreso de la inmunización se puede controlar mediante detección de los títulos de anticuerpos en el plasma o suero. Se puede utilizar un ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIB, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden recolectar células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizadoras como las células de mieloma para producir células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en el área e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (originalmente desarrollada por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256:495-497), la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4:72) y la técnica del hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células de hibridoma se pueden cribar inmuoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIB y aislar los anticuerpos monoclonales de un cultivo que comprenda dichas células de hibridoma.

El término "anticuerpo" según se usa en este documento pretende incluir los fragmentos de éste que también son específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIB. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales y los fragmentos se pueden cribar para determinar la utilidad, de la misma manera descrita antes para los anticuerpos enteros. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)₂ se pueden generar tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo puede incluir moléculas biespecíficas, de una sola cadena y quiméricas y humanizadas con afinidad por un polipéptido ActRIIB conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. El anticuerpo puede tener además un marcador unido al mismo y capaz de ser detectado (por ej., el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal y la presente divulgación pone a disposición métodos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se una específicamente a un polipéptido ActRIIB puede comprender: administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunógena que comprenda el polipéptido ActRIIB eficaz para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obtener células productoras de anticuerpos (por ej., células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos y analizar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se una específicamente al polipéptido ActRIIB. Una vez obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células derivadas del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRIIB. El anticuerpo monoclonal se puede purificar de un cultivo celular.

La expresión "específicamente reactivo con" según se usa en este documento en referencia a un anticuerpo significa, como generalmente se entiende en el área, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ej., un polipéptido ActRIIB) y otros antígenos que no son de interés de modo que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia de un antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad de unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una tendencia mayor (en comparación con los anticuerpos policlonales) para discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción antígeno-anticuerpo es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con una gama de diferentes afinidades, los anticuerpos que se prefieren en general tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menos.

Además, las técnicas utilizadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unirse a un antígeno en solución, puede ser deseable analizar la unión en solución. Varias técnicas diferentes están disponibles para analizar la interacción entre los anticuerpos y los antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmones superficiales (por ej., el ensayo de unión de Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suecia), ensayos sándwich (por ej., el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunotransferencias tipo western, ensayos de

inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a un polipéptido ActRIIB soluble. Dichos anticuerpos se pueden generar como se describió antes, usando un polipéptido ActRIIB soluble o un fragmento de éste como antígeno. Los anticuerpos de este tipo pueden ser utilizados, por ejemplo, para detectar polipéptidos ActRIIB en muestras biológicas y/o para controlar los niveles de polipéptido ActRIIB soluble en un individuo. En ciertos casos, se puede utilizar un anticuerpo que se una específicamente a un polipéptido ActRIIB soluble para modular la actividad de un polipéptido ActRIIB y/o de un ligando de ActRIIB, regulando así (promoviendo o inhibiendo) el crecimiento de tejidos, como hueso, cartílago, músculo, grasa y neuronas.

5. Ensayos de cribado

Los polipéptidos ActRIIB en cuestión (por ej., polipéptidos ActRIIB solubles) se pueden utilizar para identificar compuestos (agentes) que sean agonistas o antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados mediante este cribado se pueden analizar en tejidos como hueso, cartílago, músculo, grasa y/o neuronas, para evaluar su capacidad para modular el crecimiento del tejido in vitro. Opcionalmente, estos compuestos se pueden analizar además en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento del tejido in vivo.

Existen numerosos métodos para cribar agentes terapéuticos para la modulación del crecimiento del tejido mediante administración dirigida de los polipéptidos ActRIIB. Se puede llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturben los efectos mediados por ActRIIB sobre el crecimiento del hueso, el cartílago, el músculo, la grasa y/o las neuronas. El ensayo se puede llevar a cabo para detectar e identificar compuestos que inhiban o reduzcan específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su contraparte de unión, como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que aumenten la unión de un polipéptido ActRIIB a su proteína de unión como un ligando de ActRIIB. Los compuestos se pueden identificar por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Diversos formatos de ensayo serán suficientes y, a la luz de la divulgación de la presente, los que no están expresamente descritos en este documento serán no obstante entendidos por un técnico con experiencia en el tema. Como se describe en este documento, los compuestos de prueba (fármacos) de la invención se pueden crear por cualquier método de química combinatoria. Alternativamente, los compuestos del título pueden ser biomoléculas de origen natural, sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (fármacos) que se van a analizar en cuanto a su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden ser, producidos por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos peptidomiméticos), o producidos recombinantemente. Los compuestos de prueba considerados en este documento incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de prueba puede ser una molécula orgánica pequeña con un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 Dalton.

Los compuestos de prueba se pueden proporcionar como entidades discretas, individuales, o en bibliotecas de mayor complejidad, como las elaboradas por química combinatoria. Esas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación del compuesto de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en los pasos de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden ser derivatizados con otros compuestos y tener grupos de derivatización que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticulantes fotoactivables o combinaciones de éstos.

En muchos programas de cribado de fármacos que analizan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de prueba de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos estudiados en un período determinado de tiempo. Los ensayos que se realizan en sistemas exentos de células, como los que se pueden obtener con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como tamices "primarios" en cuanto a que se pueden generar para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en un objetivo molecular que es mediada por un compuesto de prueba. Por otra parte, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de prueba en general pueden ser ignorados en el sistema in vitro, en su lugar el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco sobre el objetivo molecular ya que se puede manifestar en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión (por ej. un ligando de ActRIIB).

Meramente para ilustrar, en un ejemplo de ensayo de investigación, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que es normalmente capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea conveniente para la intención del ensayo. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB se le agrega

después una composición que contenga un ligando de ActRIIB. La detección y la cuantificación de complejos ActRIIB/ligando de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además también se puede llevar a cabo un ensayo de control para establecer una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se agrega un ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y se cuantifica la formación del complejo ActRIIB/ligando de ActRIIB en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos puede variar y que se pueden mezclar simultáneamente. Por otra parte, en lugar de proteínas purificadas, se pueden utilizar extractos celulares y lisados para proporcionar un sistema de ensayo adecuado que carezca de células.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión se puede detectar mediante diversas técnicas. Por ejemplo, se puede cuantificar la modulación de la formación de complejos utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas detectablemente, por ejemplo, radiomarcadas (p. ej., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcadas fluorescentemente (por ejemplo, FITC), o polipéptido ActRIIB o su proteína de unión marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo, o por detección cromatográfica.

Se pueden usar ensayos de polarización de la fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) midiendo, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, como los basados en guías de onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y Pat de los Estados Unidos N° 5,677,196), resonancia de plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchos métodos.

Por otra parte, la presente divulgación contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos," para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5,283,317; Zervos et al., (1993) Cell 72:223-232; Madura et al., (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al., (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). Se pueden utilizar sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ej., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; y las patentes de los Estados Unidos N° 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

Los compuestos en cuestión se pueden identificar por su capacidad para interaccionar con un polipéptido ActRIIB de la invención. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de la proteína mediante métodos bioquímicos in vitro, incluidos foto-reticulación, unión al ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46:1). En ciertos casos, los compuestos se pueden cribar en un ensayo basado en un mecanismo, como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o fase líquida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB se puede transfectar con un sistema reportero (p. ej., β -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y cribar contra la biblioteca, preferentemente mediante un ensayo de cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Se pueden realizar ensayos de unión con el objetivo fijado a un pocillo, perla o chip, o capturado por un anticuerpo inmovilizado, o resuelto por electroforesis capilar. Habitualmente se pueden detectar los compuestos unidos usando colorimetría, fluorescencia o resonancia de plasmones superficiales.

En este documento se dan a conocer métodos y agentes para estimular el crecimiento del músculo y el aumento de la masa muscular, por ejemplo, antagonizando las funciones de un polipéptido ActRIIB y/o de un ligando de ActRIIB. Por consiguiente, cualquier compuesto identificado puede ser analizado en células enteras o tejidos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento muscular. Se pueden utilizar varios métodos conocidos en el área con este propósito. Por ejemplo, se realizan métodos en los que la transducción de la señal a través de una proteína ActRIIB activada por unión a un ligando de ActRIIB (por ej., GDF8) ha sido reducida o inhibida. Se reconocerá que el crecimiento del tejido muscular en el organismo daría lugar a un aumento de la masa muscular en el organismo en comparación con la masa muscular de un organismo correspondiente (o población de organismos) en el cual la transducción de la señal a través de una proteína ActRIIB no ha sido afectada de esa manera.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIB o los compuestos de prueba sobre la proliferación de las células musculares se puede determinar midiendo la expresión génica de Pax-3 y Myf-5 que se asocian a la proliferación de células miógenas y la expresión génica de MyoD que se asocia a la diferenciación muscular (por ej., Amthor et al., Dev Biol. 2002, 251:241-57). Se sabe que GDF8 disminuye reguladamente la expresión génica de Pax-3 y Myf-5 y previene la expresión génica de MyoD. Se espera que los polipéptidos ActRIIB o los compuestos de prueba

antagonicen esta actividad de GDF8. Otro ejemplo de análisis a base de células incluye medir la proliferación de mioblastos como mioblastos C(2)C(12) en presencia de los polipéptidos ActRIIB o los compuestos de prueba (por ej., Thomas et al., J Biol Chem. 2000, 275:40235-43).

En este documento se dan a conocer ensayos in vivo para medir la masa y la fuerza musculares. Por ejemplo, Whittemore et al. (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71) dan a conocer un método para medir una mayor masa de músculo esquelético y mayor fuerza de agarre en ratones. Opcionalmente, este método se puede usar para determinar los efectos terapéuticos de compuestos de prueba (por ej., polipéptidos ActRIIB) en enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo aquellas enfermedades en que la masa muscular es limitante.

Se pueden proporcionar métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación de hueso y aumentar la masa ósea. Por consiguiente, cualquier compuesto identificado puede ser analizado en células enteras o tejidos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento de hueso o cartílago. Se pueden utilizar diversos métodos conocidos en el área con este propósito.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIB o los compuestos de prueba sobre el crecimiento del hueso o el cartílago se puede determinar midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos a base de células (véase, por ej., Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Otro ejemplo de análisis a base de células incluye el análisis de la actividad osteogénica de los polipéptidos ActRIIB y los compuestos de prueba en células progenitoras mesenquimatosas y células osteoblásticas. A título ilustrativo, se construyeron adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido ActRIIB para infectar células progenitoras mesenquimatosas pluripotentes C3H10T1/2, células preosteoblásticas C2C12 y células osteoblásticas TE-85. La actividad osteogénica se determina después midiendo la inducción de la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y la mineralización de la matriz (véase, por ej., Cheng et al., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8):1544-52).

También se contemplan ensayos in vivo para medir el crecimiento del hueso o el cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001) dan a conocer un modelo en ratas osteoporóticas en el que se estudia la reparación ósea durante el período temprano posterior a la fractura. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) también dan a conocer un modelo en ratas osteoporóticas en el que se estudia la reparación ósea en el período tardío posterior a la fractura. Estas referencias dan a conocer un modelo en ratas para estudiar la fractura ósea osteoporótica. La presente divulgación hace uso de ensayos de consolidación de fractura conocidos en el área. Estos ensayos incluyen técnica de fractura, análisis histológico y análisis biomecánico, que se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6,521,750, que da a conocer protocolos experimentales para causar, así como para medir la magnitud de, las fracturas, y el proceso de reparación.

En este documento se dan a conocer métodos y agentes para controlar el aumento de peso y la obesidad. A nivel celular, la proliferación y diferenciación de los adipocitos es fundamental en el desarrollo de obesidad, que conduce a la generación de células grasas adicionales (adipocitos). Por consiguiente, cualquier compuesto identificado puede ser analizado en células enteras o tejidos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad de modular la adipogénesis midiendo la proliferación o diferenciación de los adipocitos. Se pueden utilizar diversos métodos conocidos en el área con este propósito. Por ejemplo, el efecto de un polipéptido ActRIIB (por ej., un polipéptido ActRIIB soluble) o compuestos de prueba sobre la adipogénesis se puede determinar midiendo la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en adipocitos maduros en ensayos a base de células, por ejemplo, observando la acumulación de triacilglicerol en vesículas teñidas con rojo O al aceite y por la aparición de ciertos marcadores de adipocitos como FABP (aP2/422) y PPAR γ 2. Véase, por ejemplo, Reusch et al., 2000, Mol Cell Biol. 20:1008-20; Deng et al., 2000, Endocrinology. 141:2370-6; Bell et al., 2000, Obes Res. 8:249-54. Otro ejemplo de ensayo a base de células incluye analizar el papel de los polipéptidos ActRIIB y los compuestos de prueba en la proliferación de los adipocitos o las células precursoras de adipocitos (por ej., células 3T3-L1), por ejemplo, monitoreando las células positivas a bromodesoxiuridina (BrdU). Véase, por ejemplo, Pico et al., 1998, Mol Cell Biochem. 189:1-7; Masuno et al., 2003, Toxicol Sci. 75:314-20.

Se entiende que los ensayos de cribado dados a conocer aplican no sólo a los polipéptidos ActRIIB y las variantes de los polipéptidos ActRIIB, sino a todos los compuestos de prueba, incluidos agonistas y antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Además, estos ensayos de cribado son útiles para la verificación del objetivo del fármaco y a efectos del control de calidad.

6. Ejemplos de usos terapéuticos

Las composiciones (por ej., los polipéptidos ActRIIB) de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada a una actividad anómala de un polipéptido ActRIIB y/o de un ligando de ActRIIB (por ej., GDF8). Estas enfermedades, trastornos o afecciones se denominan generalmente "afecciones asociadas a ActRIIB". En este documento se dan a conocer métodos para el tratamiento o la prevención de un individuo que lo necesita mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un

polipéptido ActRIIB como el descrito antes. Estos métodos apuntan particularmente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más particularmente, de humanos.

Según se usa en este documento, un agente terapéutico que "previene", un trastorno o una afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la incidencia del trastorno o la afección en la muestra tratada con respecto a una muestra testigo sin tratar, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o la afección en relación con la muestra testigo. El término "tratar" según se usa en este documento incluye la profilaxis de la afección mencionada o la mejoría o eliminación de la afección una vez que se ha instalado.

Los complejos ActRIIB/ligando de ActRIIB desempeñan papeles fundamentales en el crecimiento del tejido así como en procesos de desarrollo temprano como la formación correcta de diversas estructuras o en una o más capacidades post desarrollo como el desarrollo sexual, la producción de hormona hipofisaria y la creación de hueso y cartílago. Por lo tanto, las afecciones asociadas a ActRIIB incluyen crecimiento anómalo de tejido y defectos de desarrollo. Además, las afecciones asociadas a ActRIIB incluyen, pero no exclusivamente, trastornos de la proliferación y diferenciación celulares como inflamación, alergia, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas y tumores.

Los ejemplos de afecciones asociadas a ActRIIB incluyen trastornos neuromusculares (por ej., distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y atrofia muscular progresiva asociada a EPOC), síndrome de degeneración muscular, sarcopenia, caquexia, trastornos del tejido adiposo (por ej., obesidad), diabetes tipo 2 y enfermedad degenerativa ósea (por ej., osteoporosis). Otros ejemplos de afecciones asociadas a ActRIIB incluyen trastornos musculodegenerativos y neuromusculares, reparación tisular (por ej., cicatrización de heridas), enfermedades neurodegenerativas (por ej., esclerosis lateral amiotrófica), trastornos inmunitarios (por ej., trastornos relacionados con la proliferación o función anómala de los linfocitos) y obesidad o trastornos relacionados con la proliferación anormal de adipocitos.

En ciertas realizaciones, las composiciones (por ej., polipéptidos ActRIIB solubles) de la invención se usan como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. La expresión "distrofia muscular" se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por un debilitamiento y un deterioro graduales de los músculos esqueléticos y algunas veces de los músculos cardíaco y respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por la atrofia y la debilidad musculares progresivas que comienzan con cambios microscópicos en el músculo. A medida que los músculos se degeneran la fuerza muscular de la persona disminuye. Los ejemplos de distrofias musculares que se pueden tratar con un régimen que incluya los polipéptidos ActRIIB comprenden: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) Distrofia Muscular de Becker (BMD), Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), Distrofia Muscular de la cintura y las extremidades (LGMD), Distrofia Muscular facioescapulohumeral (FSH o FSHD) (también conocida como Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotónica (MMD) (también conocida como enfermedad de Steinert), Distrofia Muscular Oculofaríngea (OPMD), Distrofia Muscular Distal (DD), Distrofia Muscular Congénita (CMD).

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en la década de 1860. La Distrofia Muscular de Becker (BMD) recibió el nombre luego que el doctor alemán Peter Emil Becker, describió por primera vez esta variante de DMD en la década de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en varones, que afecta a uno de cada 3500 niños. La DMD se produce cuando el gen de la distrofina, ubicado en el brazo corto del cromosoma X, se rompe. Puesto que los hombres portan sólo una copia del cromosoma X, sólo tienen una copia del gen de la distrofina. Sin la proteína distrofina, el músculo se daña fácilmente durante los ciclos de contracción y relajación. Si bien al comienzo de la enfermedad el músculo compensa por regeneración, más adelante las células progenitoras del músculo no dan abasto con el daño continuo y el músculo sano es reemplazado por tejido fibro-graso no funcional.

La BMD es el resultado de diferentes mutaciones en el gen de la distrofina. Los pacientes con BMD tienen algo de distrofina, pero o bien es insuficiente o es de mala calidad. Tener algo de distrofina evita que los músculos de las personas con BMD degeneren tanto o tan rápidamente como los de las personas con DMD.

Por ejemplo, investigaciones recientes demostraron que bloquear o eliminar la función de GDF8 (un ligando de ActRIIB) in vivo puede tratar eficazmente al menos ciertos síntomas en los pacientes con DMD y BMD. Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB en cuestión pueden actuar como inhibidores de GDF8 (antagonistas), y constituyen una forma alternativa de bloquear las funciones de GDF8 y/o ActRIIB in vivo en los pacientes con DMD y BMD. Este enfoque es confirmado y respaldado por los datos que se muestran aquí, mediante los cuales una proteína ActRIIB-Fc ha demostrado aumentar la masa muscular en un modelo de distrofia muscular en ratón.

De manera similar, los polipéptidos ActRIIB proporcionan un medio eficaz para aumentar la masa muscular en otras enfermedades que necesitan crecimiento muscular. Por ejemplo, ALS, también denominada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de la neurona motora) es un trastorno del SNC crónico, incurable, que no se puede detener que ataca a las neuronas motoras, componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos esqueléticos. En

ALS, las neuronas motoras se deterioran y finalmente mueren, y aunque el cerebro de la persona normalmente permanece completamente funcional y alerta, la orden del movimiento nunca alcanza los músculos. La mayoría de las personas que padecen ALS tienen entre 40 y 70 años de edad. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son las que conducen a los brazos o piernas. Las personas con ALS pueden tener dificultad para caminar, pueden dejar caer las cosas, caerse, tener problemas para articular las palabras y reír o llorar descontroladamente. Finalmente los músculos de las extremidades comienzan a atrofiarse por la falta de uso. Esta debilidad muscular se tornará debilitante y la persona necesitará una silla de ruedas o será incapaz de funcionar fuera de la cama. La mayoría de los pacientes con ALS muere de insuficiencia respiratoria o de complicaciones de la respiración asistida como neumonía, 3 a 5 años después del inicio de la enfermedad. Este enfoque es confirmado y respaldado por los datos que se muestran aquí, mediante los cuales una proteína ActRIIB-Fc ha demostrado mejorar el aspecto, la masa muscular y la vida útil de un modelo de ALS en ratón.

El aumento de masa muscular aumentada inducido por el polipéptido ActRIIB también podría beneficiar a aquellos que sufren enfermedades de atrofia muscular progresiva. Gonzalez-Cadavid et al. (supra) informaron que esa expresión de GDF8 se correlaciona inversamente con la masa exenta de grasa en los seres humanos y que la mayor expresión del gen GDF8 se asocia a pérdida de peso en hombres con el síndrome consuntivo por SIDA. Inhibiendo la función de GDF8 en pacientes con SIDA, al menos ciertos síntomas del SIDA se pueden aliviar, si no eliminar completamente, mejorando por lo tanto significativamente la calidad de vida de los pacientes con SIDA.

Puesto que la pérdida de la función de GDF8 (un ligando de ActRIIB) también se asocia con pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes (Zimmers et al., supra; McPherron y Lee, supra), los polipéptidos ActRIIB en cuestión se pueden utilizar además como agentes terapéuticos para retrasar o prevenir la aparición de obesidad y diabetes tipo II. Este enfoque es confirmado y respaldado por los datos que se muestran en este documento, mediante los cuales se demostró que la proteína ActRIIB-Fc mejora el estado metabólico en ratones obesos.

El síndrome de anorexia-caquexia del cáncer es uno de los aspectos más debilitantes y riesgosos para la vida del cáncer. La pérdida de peso progresiva en el síndrome de anorexia-caquexia del cáncer es una característica común de muchos tipos de cáncer y es responsable no sólo de una pobre calidad de vida y una mala respuesta a la quimioterapia, sino también de un menor tiempo de supervivencia que el de pacientes con tumores comparables sin pérdida de peso. Asociada a anorexia, pérdida de grasa y tejido muscular, angustia psicológica y una menor calidad de vida, la caquexia surge de una interacción compleja entre el cáncer y el portador. Es una de las causas más comunes de muerte entre los pacientes con cáncer y está presente en el 80% de los pacientes en la muerte. Es un ejemplo complejo de caos metabólico que afecta a las proteínas, los carbohidratos y el metabolismo de las grasas. Los tumores producen anomalías tanto directas como indirectas, que resultan en anorexia y pérdida de peso. En la actualidad, no existe tratamiento para controlar o revertir el proceso. El síndrome de anorexia-caquexia del cáncer afecta la producción de citocinas, la liberación de factores que movilizan los lípidos e inducen la proteólisis, y alteraciones en el metabolismo intermediario. Aunque la anorexia es común, sólo la menor ingesta de alimentos es incapaz de justificar los cambios en la composición corporal de los pacientes con cáncer, y aumentar la ingesta de nutrientes no puede revertir el síndrome consuntivo. Se debe sospechar que existe caquexia en pacientes con cáncer si se produce una pérdida de peso involuntaria de más de cinco por ciento del peso premórbido en un período de seis meses.

Dado que se encontró que la sobreexpresión sistémica de GDF8 en ratones adultos induce pérdida profunda de músculo y grasa, análoga a la que se observa en los síndromes de caquexia humanos (Zimmers et al., supra), los polipéptidos ActRIIB como composiciones farmacéuticas pueden ser usados beneficiosamente para prevenir, tratar o aliviar los síntomas del síndrome de caquexia, cuando se desea crecimiento muscular.

En este documento se dan a conocer métodos para inducir la formación de hueso y/o cartílago, prevenir la pérdida ósea, aumentar la mineralización ósea o prevenir la desmineralización ósea. Por ejemplo, los polipéptidos y compuestos ActRIIB tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y la consolidación de fracturas óseas y defectos del cartílago en los seres humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRIIB pueden ser útiles en pacientes a los que se les diagnosticó una baja densidad ósea subclínica, como medida de protección contra la aparición o el avance de la osteoporosis.

Los métodos y las composiciones dados a conocer en este documento pueden encontrar utilidad médica en la consolidación de fracturas óseas y defectos del cartílago en los seres humanos y otros animales. Dichos métodos y composiciones también pueden tener uso profiláctico en reducción de fracturas tanto abiertas como cerradas así como en la mejor fijación de articulaciones artificiales. La formación ósea de novo inducida por un agente osteógeno contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo o por resección oncológica, y también es útil en cirugía plástica. Además, los métodos y las composiciones dados a conocer en este documento se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedad periodontal y en otros procesos de reparación dentales. En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB pueden proporcionar un entorno que atraiga osteoblastos, estimule la proliferación de osteoblastos o induzca la diferenciación de los progenitores de los osteoblastos. Los polipéptidos ActRIIB también pueden ser útiles en el tratamiento de la osteoporosis. Además, los polipéptidos

ActRIIB se pueden utilizar en la reparación de defectos del cartílago y la prevención/inversión de la osteoartritis.

La presente divulgación da a conocer un método y una composición terapéuticos para reparar fracturas y otras afecciones relacionadas con defectos del cartílago y/o el hueso o enfermedades periodontales. Además se proporcionan métodos y composiciones terapéuticos para la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Los tipos de heridas incluyen, pero no exclusivamente, quemaduras, incisiones y úlceras. Véase por ej., la publicación PCT N° WO84/01106. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los polipéptidos ActRIIB mezclado con un vehículo, portador o matriz farmacéuticamente aceptable.

Los métodos y las composiciones dados a conocer en este documento se pueden aplicar a afecciones que causan pérdida de hueso como osteoporosis, hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, tirotoxicosis, estado diarreico crónico o malabsorción, acidosis tubular renal o anorexia nerviosa. Muchas personas saben que ser mujer, tener un bajo peso corporal y llevar un estilo de vida sedentario son factores de riesgo de osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea que conduce a riesgo de fracturas). Sin embargo, la osteoporosis puede ser el resultado del uso a largo plazo de ciertos medicamentos. La osteoporosis como resultado de fármacos u otra afección médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una afección conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad de cortisol en exceso producida por el organismo da como resultado osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados a una osteoporosis secundaria son los corticoesteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque son necesarios niveles adecuados de hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroidea) para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormonas tiroideas puede disminuir la masa ósea con el paso del tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden producir pérdida ósea cuando son ingeridos en dosis altas por personas con problemas renales, particularmente las personas sometidas a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbituratos que se usan para evitar las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un fármaco para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunitarios; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un fármaco utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunitarias y para suprimir el sistema inmunitario en pacientes con trasplante de órganos; hormona liberadora de la hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), utilizada para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), utilizados para tratar la hipercolesterolemia. La enfermedad de las encías causa pérdida ósea porque esas bacterias dañinas en nuestras bocas fuerzan a nuestros organismos a defenderse contra ellas. Las bacterias producen toxinas y enzimas bajo la encía, causando una infección crónica.

Además se proporcionan métodos y agentes terapéuticos para tratar enfermedades o trastornos asociados a un crecimiento óseo anómalo o indeseado. Por ejemplo, los pacientes que tienen la enfermedad conocida como Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) desarrollan un "segundo esqueleto" anormal que impide cualquier movimiento. Por otra parte, se puede producir crecimiento óseo anómalo luego de una cirugía de reemplazo de cadera y esto arruina el resultado quirúrgico. Este es un ejemplo más común de crecimiento óseo patológico y una situación en la cual los métodos y las composiciones en cuestión pueden ser terapéuticamente útiles. Los mismos métodos y composiciones también puede ser útiles para tratar otras formas de crecimiento óseo anómalo (por ej., crecimiento patológico del hueso luego de traumatismo, quemaduras o lesión de la médula ósea), y para tratar o prevenir las afecciones indeseables asociadas al crecimiento anómalo del hueso observadas en relación con el cáncer prostático metastásico o el osteosarcoma. Los ejemplos de estos agentes terapéuticos incluyen, pero no exclusivamente, los polipéptidos ActRIIB que antagonizan la función de un ligando de ActRIIB (por ej., BMP7), los compuestos que interrumpe la interacción entre un ActRIIB y su ligando (por ej., BMP7), y los anticuerpos que se unen específicamente a un receptor ActRIIB de modo que un ligando de ActRIIB (por ej., BMP7) no se pueda unir al receptor ActRIIB.

También se dan a conocer en este documento composiciones y métodos para regular el contenido de grasa corporal en un animal y para tratar y prevenir afecciones relacionadas con ello, y particularmente, afecciones que comprometen la salud relacionadas con ello.

Regular (controlar) el peso corporal puede referirse a reducir o aumentar el peso corporal, disminuir o incrementar la velocidad de aumento de peso, o incrementar o disminuir la velocidad de pérdida de peso, y también incluye mantener activamente, o no cambiar significativamente, el peso corporal (por ej., frente a influencias externas o internas que de lo contrario podrían aumentar o disminuir el peso corporal). El peso corporal se puede regular administrando a un animal (por ej., un ser humano) que lo necesita un polipéptido ActRIIB.

Asimismo se dan a conocer en este documento métodos y compuestos para reducir el peso corporal y/o reducir el aumento de peso en un animal, y más particularmente, para tratar o mejorar la obesidad en pacientes que corren riesgo de sufrir o que sufren de obesidad. Se dan a conocer métodos y compuestos para tratar un animal que es incapaz de aumentar o mantener el peso (por ej., un animal con un síndrome consuntivo). Dichos métodos son eficaces para aumentar el peso y/o la masa corporales, o para reducir la pérdida de peso y/o de masa, o para mejorar afecciones asociadas a, o causadas por, un peso y/o una masa corporales indeseablemente bajos (por ej.,

no saludables).

Otros trastornos, incluida la hipercolesterolemia, que se pueden tratar con las proteínas ActRIIB se describen en los ejemplos.

7. Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los compuestos (por ej., los polipéptidos ActRIIB) de la presente invención se formulan con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Dichos compuestos se pueden formular para la administración de cualquier manera conveniente para el uso en humanos o en medicina veterinaria.

En ciertas realizaciones, la composición se puede administrar por vía tópica, sistémica o local, en un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para usar en esta invención es, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, apirógena. Además, convenientemente la composición se puede encapsular o inyectar en una forma viscosa para la administración a un sitio deseado de un tejido (por ej., hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo, un sitio que tenga un daño tisular. La administración tópica puede ser adecuada para la curación de heridas y la reparación de tejidos. En los métodos de la invención, otros agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos ActRIIB que también pueden ser incluidos en la composición, como se describió antes, se pueden administrar, alternativa o adicionalmente, simultánea o consecutivamente, con los compuestos en cuestión (por ej., polipéptidos ActRIIB).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de liberar uno o más compuestos terapéuticos (por ej., polipéptidos ActRIIB) a un sitio deseado de un tejido (por ejemplo, hueso), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el organismo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIB. Dichas matrices se pueden elaborar de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de la interfase. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirá la formulación adecuada. Las matrices posibles para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales posibles son biodegradables y biológicamente bien definidos, como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices están compuestas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices posibles son no biodegradables ni químicamente definidas, como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos de materiales mencionados antes, como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Se puede alterar la composición de las biocerámicas como en fosfato aluminato de calcio y procesar para modificar el tamaño del poro, el tamaño de partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (utilizando una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales, y análogos, cada uno con una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, remedio edulcorado o pasta.

En las formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, como citrato de sodio, fosfato dicálcico, o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o diluyentes, como almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, como glicerol; (4) desintegrantes, como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) retardantes de la solución, como vaselina; (6) aceleradores de la absorción, como compuestos de amonio cuaternario; (7) humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de estos; y (10) colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir tampones. También se pueden emplear composiciones sólidas similares como relleno de cápsulas de gelatina blanda y dura utilizando excipientes como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, emulsiones microemulsiones, soluciones,

suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados corrientemente en el área, como agua u otros solventes, solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, tetrahidrofurfuro, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y sus mezclas. Aparte de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden contener adyuvantes como humectantes, emulsionantes y suspendentes, edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumes y conservantes.

Las suspensiones, además de los principios activos, pueden contener suspendentes como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol, y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

Ciertas composiciones dadas a conocer aquí se pueden administrar tópicamente, ya sea en la piel o en las membranas mucosas. Las formulaciones tópicas pueden contener además uno o más de una amplia gama de agentes que se sabe que son eficaces como potenciadores de la penetración de la piel o el estrato córneo. Los ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, dimetilsulfóxido y azona. También se pueden incluir otros agentes para obtener una formulación aceptable para uso cosmético. Los ejemplos de estos son grasas, ceras, aceites, tinturas, fragancias, conservantes, estabilizantes y tensioactivos. También se pueden incluir agentes queratolíticos como los conocidos en el área. Los ejemplos son ácido salicílico y azufre.

Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica incluyen polvo, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El principio activo se puede mezclar en condiciones asépticas con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda ser necesario. Las pomadas, las pastas, las cremas y los geles pueden contener además del compuesto de la invención (por ej., un polipéptido ActRIIB), excipientes, como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, vaselinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonita, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o sus mezclas.

Los polvos y los aerosoles pueden contener, además del compuesto en cuestión, excipientes como lactosa, talco, ácido silícico e hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener además propelentes corrientes, como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, como butano y propano.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden contener uno o más polipéptidos ActRIIB en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que tornan la formulación isotónica con la sangre del destinatario, o suspendentes o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes, como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar incluyendo diversos antibióticos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y análogos. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio y análogos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico tratante considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos de la invención (por ej., polipéptidos ActRIIB). Los diversos factores dependerán de la enfermedad a tratar. En el caso de trastornos musculares, los factores pueden incluir, pero no exclusivamente, la cantidad de masa muscular que se desea formar, los músculos más afectados por la enfermedad, el estado del músculo deteriorado, la edad, el género y la dieta del paciente, el tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosis. El progreso se puede controlar mediante evaluaciones periódicas del crecimiento y/o la reparación muscular, por ejemplo, probando la fuerza, evaluando por resonancia magnética el tamaño del músculo y mediante análisis de biopsias musculares.

Se pueden administrar uno o más de los polipéptidos ActRIIB, juntos (simultáneamente) o en momentos diferentes (secuencialmente o superpuestos). Además, los polipéptidos ActRIIB se pueden administrar con otro tipo de agentes terapéuticos, por ejemplo, un inductor de cartílago, un osteoinductor, un inductor muscular, un reductor de grasa, o un inductor de neuronas. Los tipos de compuestos se pueden administrar simultáneamente o en momentos diferentes. Se espera que los polipéptidos ActRIIB de la invención puedan actuar de concierto con o quizás sinérgicamente, con otro agente terapéutico.

En un ejemplo específico, se describieron diversos factores osteogénicos, inductores de cartílago y osteoinductores, particularmente bisfosfonatos. Véase por ej., las solicitudes de Patente Europea 148,155 y 169,016. Por ejemplo, otros factores que se pueden combinar con los polipéptidos ActRIIB en cuestión incluyen diversos factores del crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β), y el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF).

También se da a conocer una genoterapia para la producción in vivo de los polipéptidos ActRIIB. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de secuencias del polinucleótido ActRIIB en las células o tejidos que tienen los trastornos mencionados antes. La administración de secuencias del polinucleótido ActRIIB se puede lograr usando un vector de expresión recombinante como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la administración terapéutica de las secuencias del polinucleótido ActRIIB se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

Los diversos vectores virales que se pueden utilizar para la genoterapia instruida en este documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia, o preferentemente, un virus de ARN como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los cuales se puede un único gen extraño incluyen, pero no exclusivamente: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen de un marcador seleccionable de modo que se puedan identificar y generar células transducidas. Se pueden preparar vectores retrovirales específicos para el objetivo, uniendo por ejemplo un azúcar, un glucolípido o una proteína. La administración dirigida preferida se lleva a cabo utilizando un anticuerpo. Los expertos en el área reconocerán que se pueden insertar secuencias específicas del polinucleótido en el genoma retroviral o unir a una envoltura viral para permitir la administración al objetivo específico del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIB. El vector se puede dirigir a las células o los tejidos del hueso, el cartílago, el músculo o las neuronas.

Alternativamente, las células de cultivos tisulares se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. Estas células se transfectan después con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para los polinucleótidos ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas, sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido puede ser un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales útiles como vehículo de administración in vitro e in vivo. Los viriones de ARN, ADN e intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y administrar a las células de forma biológicamente activa (véase p. ej., Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:17, 1981). Los métodos para la transferencia genética eficaz usando un vehículo liposómico, son conocidos en el área, véase por ej., Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidilo, como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearilfosfatidilcolina. La administración dirigida de liposomas también es posible basándose, por ejemplo, en la especificidad por un órgano, la especificidad por una célula y la especificidad por un organelo, y es conocida en el área.

Ejemplos

La invención que se está describiendo en general, se entenderá más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen únicamente con fines ilustrativos de ciertas realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la misma.

Ejemplo 1. Generación de una proteína de fusión ActRIIB-Fc.

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIb soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIb humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo (tres aminoácidos glicina) en medio. Los constructos se mencionan como ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc, respectivamente.

5 A continuación se muestra ActRIIb-hFc como se purificó de líneas celulares CHO (SEC. ID N°: 5)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTG
GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 Las proteínas ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

(i) Melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALLVFMVVYISYIYA (SEC. ID N°: 7)

15 (ii) Activador del plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEC. ID N°: 8)

(iii) Nativa: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEC. ID N°: 9).

La forma elegida emplea la secuencia líder TPA y tiene la secuencia de aminoácidos sin procesar siguiente:

20 MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEG
EQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF
CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Este polipéptido es codificado por la secuencia de ácido nucleico siguiente (SEC. ID N°: 10):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG
GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCACATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CAGGCCTCCC GTGCTGGACT
25 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG

GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
GCCTCTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

30

La secuenciación N-terminal del material producido por las células CHO que reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEC. ID N°: 11). Cabe destacar, que otros constructos informados en la bibliografía comienzan con una secuencia -SGR...

5 La purificación se pudo lograr mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, incluidos, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía con proteína A, cromatografía con sefarosa Q, cromatografía con fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se pudo completar con filtración viral e intercambio de tampón.

10 Las proteínas de fusión ActRIIb-Fc también se expresaron en células HEK293 y células y COS. Aunque el material de todas las líneas celulares y condiciones de cultivo razonables proporcionaron proteína con actividad de fabricación de músculo in vivo, se observó variabilidad en la potencia quizás relacionada a la elección de la línea celular y/o las condiciones de cultivo.

15 Ejemplo 2: Generación de mutantes de ActRIIb-Fc

Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes como proteína de fusión soluble entre el dominio extracelular de ActRIIB y un dominio Fc. Por lo tanto, la fusión ActRIIb-Fc de origen tiene la secuencia (porción Fc subrayada)(SEC. ID N°: 12):

20 **SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG**
CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPTAPT
GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTOKSLSLSPGK

25 Se introdujeron diversas mutaciones, incluidos truncamientos N- y C-terminales, en la proteína ActRIIB-Fc de origen. Basándose en los datos presentados en el ejemplo 1, se espera que estos constructos, si se expresan con una líder TPA, carezcan de serina N-terminal. Las mutaciones se generaron en el dominio extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Luego de la PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, se digirieron con SfoI y AgeI y se purificaron en gel. Estos fragmentos se ligaron en el vector de expresión pAID4 (véase WO2006/012627) de modo que luego del ligamiento creó una quimera por fusión con IgG1 humana. Luego de la transformación en E. coli DH5 alfa, se picaron las colonias y se aislaron los ADN. Para los constructos murinos (mFc), se substituyó una IgG2a murina por la IgG1 humana. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

30 Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T por transfección transitoria. En resumen, en un centrifugador de 500 ml, se acondicionaron células HEK293T a una concentración de 6×10^5 células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250 ml y se cultivaron durante toda la noche. Al día siguiente, esas células se trataron con complejo ADN:PEI (1:1) a una concentración final de ADN de 0.5 µg/ml. Luego de 4 h, se agregaron 250 ml de medio y las células se cultivaron durante 7 días. El medio acondicionado se recogió centrifugando las células y concentrando.

35 Los mutantes se purificaron utilizando diversas técnicas, como, por ejemplo, columna de proteína A y se eluyeron con tampón de glicina de pH bajo (3.0). Luego de la neutralización, éstos se dializaron contra PBS.

Los mutantes también se produjeron en células CHO con una metodología similar.

40 Los mutantes se analizaron en ensayos de unión y/o bioensayos descritos más adelante. En algunos casos, los ensayos se realizaron con medio acondicionado en vez de con proteínas purificadas.

Ejemplo 3. Bioensayo para señalización mediada por GDF-11 y activina.

45 Se usó un ensayo de gen reportero A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc sobre la señalización por GDF-11 y activina A. Línea celular: rhabdomyosarcoma humano (derivado de músculo). Vector reportero: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17:3091-3100.) Véase Figura 5. El motivo CAGA12 está presente en los genes sensibles de TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores que señalizan a través de Smad 2 y 3.

55 Día 1: dividir las células A-204 en placas de 48 pocillos.

Día 2: transfectar las células A-204 con 10 µg de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12(10 µg)+ pRLCMV (1 µg) y Eugene.

Día 3: agregar factores (diluidos en medio + 0.1% de BSA). Los inhibidores necesitan ser preincubados con los factores durante 1 h antes de agregarlos a las células. Seis horas más tarde, enjuagar las células con PBS, y lisar las células.

Esto es seguido del ensayo de Luciferasa. En ausencia de cualquier inhibidor, la activina A mostró 10 veces la estimulación de la expresión del gen reportero y una $DE_{50} \sim 2$ ng/ml. GDF-11: 16 veces estimulación, $DE_{50}: \sim 1.5$ ng/ml.

ActRIIB(R64, 20-134) es un inhibidor potente de la actividad de la activina, GDF-8 y GDF-11, en este ensayo. En este ensayo se analizaron también las variantes.

Ejemplo 4. Inhibición de GDF-11 por los truncamientos N-terminal y C-terminal

Se generaron truncamientos en el extremo N-terminal y C-terminal de la porción ActRIIB de ActRIIB-Fc (R64, 20-134) y se determinó su actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios acondicionados):

Truncamientos C-terminales de ActRIIB-hFc:

	CI ₅₀ (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB-hFc (R64, 20-134)	45	22
ActRIIB-hFc (R64, 20-132)	87	32
ActRIIB-hFc (R64, 20-131)	120	44
ActRIIB-hFc (R64, 20-128)	130	158

Como se puede ver, los truncamiento de tres (que finalizan con...PPT), seis (que finalizan con...YEP) o más aminoácidos en el extremo C-terminal causa una disminución de 3 veces o más de la actividad de la molécula. El truncamiento de los 15 aminoácidos finales de la porción ActRIIB causa una pérdida de actividad mayor (véase WO2006/012627).

Los truncamientos amino terminales se hicieron en la proteína de origen de ActRIIB-hFc (R64 20-131). Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios acondicionados):

Truncamientos N-terminales de ActRIIB-hFc:

	CI ₅₀ (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB-hFc (R64, 20-131) (GRG...)	183	201
ActRIIB-hFc (R64, 21-131) (RGE...)	121	325
ActRIIB-hFc (R64, 22-131) (GEA...)	71	100
ActRIIB-hFc (R64, 23-131) (EAE...)	60	143
ActRIIB-hFc (R64, 24-131) (AET...)	69	105

En consecuencia, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N- terminal condujeron a la producción de una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud normal. Otros experimentos muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIB-hFc (R64, 25-131) tiene una actividad equivalente a la de la forma sin truncamiento, y deleciones adicionales en el extremo N-terminal continúan degradando la actividad de la proteína. Por consiguiente, los constructos óptimos tendrán un extremo C-terminal que finalice entre los aminoácidos 133-134 de SEC. ID N°: 4 y un extremo N-terminal que comience en los aminoácidos 22-24 de SEC. ID N°: 4. Un extremo N-terminal correspondiente a los aminoácidos 21 o 25 proporcionará una actividad similar a la del constructo ActRIIB-hFc (R64, 20-134).

Ejemplo 5. Variantes de ActRIIB-Fc, actividad a base de células.

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc se determinó en un ensayo a base de células, según se describe antes. Los resultados se resumen en la tabla 1. Algunas variantes se analizaron en constructos de truncamiento C-terminal diferentes. Como se trató antes, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos causaron reducción de la actividad. Sorprendentemente, las variantes L79D y L79E mostraron una pérdida sustancial de la unión a activina manteniendo casi toda la inhibición natural de GDF-11.

Unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF11 y activina A:

Variaciones de ActRIIB-Fc	de	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de SEC. ID N°: 4)	Inhibición de la actividad de GDF11	Inhibición de la actividad de activina
64R		20-134	+++ (aprox. 10^{-8} M K_i)	+++ (aprox. 10^{-8} M K_i)
64A		20-134	+++ (aprox. 10^{-6} M K_i)	+ (aprox. 10^{-6} M K_i)
64R		20-129	+++	+++
64R K74A		20-134	++++	++++
64R A24N		20-134	+++	+++
64R A24N		20-119	++	++
64R A24N K74A		20-119	+	+
R64 L79P		20-134	+	+
R64 L79P K74A		20-134	+	+
R64 L79D		20-134	+++	+
R64 L79E		20-134	+++	+
R64K		20-134	+++	+++
R64K		20-129	+++	+++
R64 P129S P130A		20-134	+++	+++
R64N		20-134	+	+
+ Actividad pobre (aproximadamente 1×10^{-6} K_i) ++ Actividad moderada (aproximadamente 1×10^{-7} K_i) +++ Actividad buena (natural) (aproximadamente 1×10^{-8} K_i) ++++ Actividad mayor que la natural				

Se evaluaron varias variantes con respecto a la vida media sérica en ratas ActRIIB(R64 20-134)-Fc tiene una vida media sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(R64 A24N 20-134)-Fc tiene una vida media sérica de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividad en el ensayo a base de células (supra) y en los ensayos in vivo (más adelante) que son equivalentes a las de la molécula natural. Acoplada con la vida media más larga, esto significa que con el tiempo la variante A24N proporcionará mayor efecto por unidad de proteína que la molécula natural.

Sorprendentemente, la introducción de aminoácidos ácidos (ácido aspártico o glutámico) en la posición 79 disminuyó selectivamente la unión a activina manteniendo la unión a GDF11/GDF8. Como se trata más adelante, las proteínas ActRIIB-Fc naturales parecen tener efectos sobre tejidos distintos del muscular, algunos de los cuales pueden ser indeseables. Según se da a conocer en este documento, se espera que esos efectos se relacionen con los varios ligandos diferentes que están unidos a, y son inhibidos por, ActRIIB-Fc, incluida, quizás, la activina. Los datos iniciales indican que, en los ratones, las variantes L79E y L79D tienen menores efectos sobre los tejidos diferentes del muscular manteniendo simultáneamente sus efectos sobre el músculo. Aunque las variaciones de este tipo pueden ser vistas como variantes de ActRIIB, se debe notar que estas proteínas ya no actúan como verdaderos receptores de activina, y por lo tanto el apodo "ActRIIB" es adecuado sólo como un indicador de la derivación de esos polipéptidos. Aunque los residuos ácidos en la posición 79 disminuyen la unión a activina mientras mantienen la unión a GDF11, otras alteraciones en esta posición no tienen este efecto. Un cambio L79A aumenta la unión a activina con respecto a la unión a GDF11. Un cambio L79P disminuye tanto la unión a activina como a GDF11.

Ejemplo 6. Unión a GDF-11 y activina A.

La unión de ciertas proteínas ActRIIB-Fc a los ligandos se analizó en un ensayo BiaCore™.

- 5 Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína natural se capturaron en el sistema usando un anticuerpo anti-hFc. Los ligandos se inyectaron y se hicieron fluir sobre las proteínas receptor capturadas. Los resultados se resumen en las tablas siguientes.

Especificidad de unión al ligando de variantes IIB.

GDF11			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	1.21 e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6.77e-5	2.41 e-5	3.56e-11
GDF8			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)			
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	2.25e-5	4.71 e-5	2.1e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB-hFc (R64, K74A 20-134)	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
Activina A			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)			Baja unión
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)			Baja unión
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	7.46e6	6.28e-4	8.41 e-11
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

- 15 Estos datos confirman los datos del ensayo a base de células, que demuestran que la variante A24N mantiene una actividad de unión al ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB-hFc (R64 20-134), y que la molécula L79D o L79E mantiene la unión a miostatina y GDF11 pero muestra una notable disminución (no cuantificable) de la unión a activina A.

- 20 Se generaron y se analizaron otras variantes, como se informa en WO2006/012627, utilizando ligandos acoplados al dispositivo y receptor fluyendo sobre los ligandos acoplados. Más adelante se reproduce una tabla de datos con respecto a esas variantes:

Unión de variantes de ActRIIB-Fc solubles a GDF11 y activina A (ensayo BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD = 1.8e-7 M (+)	KD = 2.6e-7 M (+)
WT (64R)	n/a	KD = 8.6e-8 M (+++)
+15tail	KD ~2.6 e-8 M (+++)	KD = 1.9e-8 M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD = 4.35e-9 M +++++	KD = 5.3e-9 M +++++
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	-
F82A	++	-
* No se observó unión -- < 1/5 la unión a WT - ~ 1/2 la unión a WT + WT ++ < 2x mayor unión +++ ~5x mayor unión ++++ ~10x mayor unión +++++ ~ 40x mayor unión		

Ejemplo 7: El efecto de las proteínas ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones silvestres.

Los solicitantes determinaron la capacidad de la proteína ActRIIB-Fc para aumentar la masa muscular en ratones silvestres.

Se administró a ratones C57B110 (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) 2 veces/semana la proteína ActRIIB humana (R64 20-134) o la ActRIIB humana (K74A 20-134). Se realizó una resonancia magnética de los ratones el día 0 y el día 28 para determinar el cambio porcentual de la masa de tejido magro de todo el cuerpo. Los ratones tratados con ActRIIB humana (R64 20-134)-Fc mostraron un aumento significativo de 31.1% en el tejido magro en comparación con el grupo de control con vehículo. Los ratones tratados con la proteína ActRIIB humana (K74A 20-134)-Fc mostraron un incremento significativo en el aumento de masa de tejido magro en comparación con la cohorte de control, aunque en menor medida que el grupo tratado con ActRIIB humana (R64 20-134). En un estudio similar, los ratones se trataron 2 veces/semana con PBS, 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc, por vía intraperitoneal. Al final del estudio, los músculos femorales, gemelos, pectorales y diafragma se disecaron y pesaron. Los resultados se resumen en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Pesos de los tejidos de ratones silvestres tratados con vehículo y ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc

Tratados con vehículo	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) $\pm$ desviación est.	0.306 $\pm$ 0.020	0.187 $\pm$ 0.040	0.257 $\pm$ 0.020	0.076 $\pm$ 0.020
μ ActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) $\pm$ desviación est.	0.387 $\pm$ 0.010	0.241 $\pm$ 0.014	0.360 $\pm$ 0.070	0.124 $\pm$ 0.040
Prueba T valor p	0.0001	0.009	0.02	0.04

Como se muestra en la tabla 3, la proteína de fusión ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc aumenta significativamente la masa muscular en ratones silvestres. En los ratones tratados con ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc, los músculos gemelos aumentaron 26.5%, los músculos femorales aumentaron 28.9%, los músculos pectorales aumentaron 40.0%. También observamos cambios en el músculo diafragma que aumentó un 63% en comparación con los ratones de control tratados con vehículo. La disminución del músculo diafragma es una complicación común en diversas distrofias musculares. Por lo tanto el aumento en el peso del diafragma observado después del tratamiento con ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc podría tener importancia clínica.

Ejemplo 8: El efecto de las proteínas ActRIIB-Fc de vida media larga sobre la masa muscular en ratones silvestres.

Los solicitantes determinaron la capacidad de la variante de vida media larga de la proteína ActRIIB-mFc (R64, A24N 20-134) para aumentar la masa muscular en ratones silvestres.

Se administró a ratones C57B110 (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) 2 veces/semana la proteína ActRIIB humana-mFc (R64 20-134) o la ActRIIB humana-mFc (R64, A24N, 20-134). Se realizó una resonancia magnética de los ratones en diversos puntos hasta el día 25 para determinar el cambio porcentual de la masa de tejido magro en todo el cuerpo. Ambas moléculas causaron aumentos equivalentes en el peso corporal total y las masas musculares, variando los efectos sobre los músculos gemelos, femorales y pectorales entre 40 y 70% de aumento. Véanse las figuras 5 y 6.

Estos datos mostraron que la forma de mayor vida media de la molécula promueve el crecimiento muscular en un estudio de corto plazo con una potencia equivalente a la de la molécula natural.

Ejemplo 9: El efecto de las proteínas ActRIIB-Fc con menor unión a activina sobre la masa muscular en ratones silvestres.

Los solicitantes determinaron la capacidad de la variante de vida media larga de la proteína ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134) para aumentar la masa muscular en ratones silvestres.

Se administró a ratones C57B110 (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) 2 veces/semana la proteína ActRIIB humana-mFc (R64 20-134) o la ActRIIB humana-mFc (R64, L79D 20-134). Se realizó una resonancia magnética de los ratones en diversos puntos hasta el día 24 para determinar el cambio porcentual de la masa de tejido magro de todo el cuerpo. Los datos se muestran en la tabla siguiente.

	Peso corporal día 0 (g)	Peso corporal día 24 (g)	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pecs (L+R)
Mod. TBS (pp/v)	24.4 $\pm$ 1.51	26.8 $\pm$ 1.43	0.29 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.05
R64, 20-134 (10 mg/kg)	25.0 $\pm$ 1.36	31.2* $\pm$ 1.53	0.40* $\pm$ 0.02	0.24* $\pm$ 0.02	0.37* $\pm$ 0.07
R64, L79D, 20-134 (10 mg/kg)	25.3 $\pm$ 1.22	28.1 $\pm$ 1.64	0.32* $\pm$ 0.02	0.20* $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.05
					* p<0.05

Estos datos demuestran que la variante L79D (menor unión a activina A) de ActRIIB es activa in vivo para promover el crecimiento muscular, sin embargo, la cantidad de crecimiento muscular es menor que para la ActRIIB natural. Este efecto disminuido puede ser causado en parte por la ligera reducción en la unión a miostatina o por la pérdida de unión a otro regulador negativo del crecimiento muscular, hasta ahora desconocido. Es muy deseable la capacidad de estimular el crecimiento muscular sin afectar la señalización de activina A porque la activina es una molécula reguladora expresada ampliamente que se sabe que tiene efectos sobre el aparato reproductor, el hueso,

el hígado y muchos otros tejidos. En los ratones, ActRIIB-mFc (R64 20-134) causa efectos sustanciales sobre el aparato reproductor y, en algunos casos, causa un aumento en el tamaño del bazo. La molécula ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134) tuvo efectos muy atenuados sobre los tejidos reproductores y el bazo, lo que indica que esta molécula será particularmente adecuada para promover el crecimiento muscular en pacientes que son reproductivamente activos o tienen el deseo de minimizar los efectos sobre el aparato reproductor.

Ejemplo 10: El efecto de la proteínas ActRIIB-Fc sobre la masa y la fuerza musculares en ratones *Mdx*.

Para determinar la capacidad de la proteína ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc para aumentar la masa muscular en un estado patológico, los solicitantes determinaron la capacidad de la proteína ActRIIB-Fc para aumentar la masa muscular en el modelo de distrofia muscular en ratón *mdx*.

Se trataron ratones *Mdx* adultos 2 veces/semana con la proteína ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc (1, 3 o 10 mg/kg; intraperitoneal) o con vehículo PBS de control. Se midió la fuerza que ejerce un ratón al tirar de un transductor de fuerza para determinar la fuerza de agarre del miembro anterior. Se utilizó la fuerza promedio de 5 ensayos de tracción para comparar la fuerza de agarre entre las cohortes. Al final del estudio, los músculos femorales, gemelos, pectorales y el diafragma se disecaron y pesaron. Las mediciones de la fuerza de agarre también mostraron un aumento significativo. Los resultados de masa muscular se resumen en la tabla siguiente.

Pesos de los tejidos de ratones *mdx* tratados con vehículo y ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc

Tratados con vehículo	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) $\pm$ desviación est.	0.413 $\pm$ 0.040	0.296 $\pm$ 0.019	0.437 $\pm$ 0.060	0.111 $\pm$ 0.030
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) $\pm$ desviación est.	0.52 $\pm$ 0.050	0.39 $\pm$ 0.05	0.807 $\pm$ 0.21	0.149 $\pm$ 0.020
Prueba T valor p	0.0006	0.0006	0.002	0.05

Como se ilustra en la tabla, los grupos tratados con ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc mostraron mayor masa de tejido magro en los ratones *mdx* en comparación con los ratones tratados con PBS. El tratamiento con ActRIIB-Fc aumentó el tamaño de los músculos gemelos 25.9%, el tamaño de los femorales 31.8% y de los pectorales en 85.4% en comparación con el grupo de control tratado con vehículo. También encontramos, de posible importancia clínica, que los pesos de los diafragmas de los ratones tratados con ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc aumentaron 34.2% en comparación con la cohorte de control. Estos datos demuestran la eficacia de la proteína ActRIIB-Fc en un estado patológico de distrofia muscular.

Además los ratones *mdx* tratados con la proteína ActRIIB-Fc mostraron mayor fuerza de agarre en comparación con los controles tratados con vehículo. A las 16 semanas, los grupos que recibieron 1, 3 y 10 mg/kg de ActRIIB mostraron un aumento en la fuerza de agarre de 31.4%, 32.3% y 64.4%, respectivamente, en comparación con el grupo de control tratado con vehículo. La mayor fuerza de agarre de los grupos tratados con ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc respalda la idea de que el aumento muscular encontrado en los grupos de tratamiento es fisiológicamente importante. Los ratones *mdx* son propensos a lesión contráctil-inducida y pasan por significativamente más ciclos de degeneración y regeneración que sus contrapartes silvestres. Independientemente de esos fenotipos musculares, el tratamiento con ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc aumenta la fuerza de agarre en los ratones *mdx*.

En la distrofia muscular de Duchenne, el inicio de la enfermedad se produce en los primeros años de la niñez, a menudo tan pronto como a los 5 años. En consecuencia, los datos presentados antes con respecto a los ratones adultos no reflejan necesariamente los efectos que una molécula de ActRIIB tendría sobre un niño con DMD. Para ocuparse de esto, se llevó a cabo un estudio con ratones *mdx* juveniles.

El tratamiento con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) aumenta significativamente el peso corporal en ratones juveniles (cuatro semanas de vida) C57BL10 y *mdx*. Un análisis de la composición corporal utilizando espectroscopía de resonancia magnética in vivo reveló un aumento de masa de tejido magro acompañado de mayores pesos corporales. Los ratones C57BL/10 tratados con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) aumentaron 35.2% la masa de tejido magro y el grupo *mdx* tratado aumentó un 48.3% más la masa de tejido magro que sus respectivas cohortes de control. Además, se evaluó el efecto del tratamiento con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) sobre la fuerza. Las puntuaciones de fuerza de agarre de los ratones *mdx* tratados con vehículo fueron 15.7% menores que las de la cohorte C57BL/10 tratada con vehículo, ilustrando así la debilidad muscular asociada a la deficiencia de distrofina. En contraste, los ratones *mdx* tratados con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) mejoraron su fuerza de agarre en comparación con el grupo *mdx* tratado con vehículo, y lograron medidas de fuerza de agarre que sobrepasaron las

de los ratones C57BL/10 tratados con vehículo y alcanzaron el nivel de puntuación de la fuerza de agarre de los C57BL/10 tratados (mdx tratados con vehículo: 0.140 ± 0.01 KgF; mdx tratados: 0.199 ± 0.02 KgF; C57BL/10 tratados con vehículo: 0.166 ± 0.03 ; 0.205 ± 0.02 KgF). Sorprendentemente, el tratamiento restituyó en los ratones mdx juveniles los niveles naturales de fuerza de agarre. Por consiguiente, es probable que la molécula ActRIIB-mFc (R64, 20-134) tenga aplicaciones clínicas importantes en la distrofia muscular de Duchenne, particularmente en pacientes juveniles a una edad próxima a la de inicio de la enfermedad.

Ejemplo 11: El efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la fuerza y la supervivencia en ratones SOD1

Para determinar la capacidad de los polipéptidos ActRIIB para aumentar la fuerza y la supervivencia en un modelo de ALS en ratón, los solicitantes probaron la proteína ActRIIB-Fc en el ratón SOD1.

Los ratones B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, o SOD1, tienen elevadas cantidades de copias del alelo mutante del transgén de la superóxido dismutasa humana. Altos niveles de esta proteína confieren un fenotipo al ratón que es comparable al de la enfermedad ALS humana. Los ratones SOD1 presentan una parálisis ascendente y muestran signos precoces de la enfermedad hacia los 91 días. La enfermedad da como resultado la muerte prematura que se produce entre las 19 y las 23 semanas de vida.

A los ratones SOD1 se les administró vehículo de control o ActRIIB-mFc (K74A 20-134) (i.p., 5 mg/kg, 2 veces/semana) comenzando a las 10 semanas de vida. La fuerza que ejerce un ratón al tirar de un transductor de fuerza es una medida de la fuerza de agarre del miembro anterior. Se utilizó la fuerza promedio de 5 ensayos de tracción para comparar la fuerza de agarre entre las cohortes. Se calculó la supervivencia como el número de días entre la fecha en que nació el ratón y la fecha en que el ratón fue incapaz de enderezarse en los 30 segundos siguientes a ser colocado de lado. La figura 7 muestra las mediciones de fuerza de agarre y la figura 8 ilustra los datos de supervivencia.

Los ratones en la etapa final de la enfermedad tienen dificultad para acicalarse, presumiblemente debido al avance de la parálisis, y parecen desaliñados. La observación superficial de los ratones reveló que el grupo de tratamiento con ActRIIB murina (K74A 20-134)-Fc parecía bien acicalado incluso en las etapas finales de la enfermedad, en comparación con el grupo tratado con PBS. Esta observación sugiere que los ratones tratados están más saludables y mantienen una mejor calidad de vida que los controles.

Como se ve en la figura 7, los ratones SOD1 que recibieron el tratamiento con ActRIIB murina (K74A 20-134)-Fc muestran una fuerza de agarre significativamente mayor en comparación con la cohorte de control tratada con PBS. Esto se ve en el día 117, la etapa temprana de la enfermedad, así como luego de que la enfermedad progresó en el día 149. La figura 8 ilustra que los ratones tratados con ActRIIB (K74A 20-134)-Fc sobrevivieron significativamente más tiempo que los controles tratados con vehículo. Este estudio ilustra la utilidad de la ActRIIB murina (K74A 20-134)-Fc en el modelo de ALS en ratón para mejorar tanto la fuerza como la supervivencia de los ratones.

Se llevó a cabo un experimento similar con ratones SOD1, pero el tratamiento se postergó hasta que el inicio de la enfermedad fue detectable a simple vista (día 130), de modo de imitar mejor el tratamiento de la ALS humana luego del inicio de los síntomas significativos de la enfermedad. En el día 130, los ratones SOD1 se dividieron en los grupos tratados con vehículo (TBS modificado) o con ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg). Los ratones recibieron una dosis subcutánea una vez por semana. Se realizó una resonancia magnética de los ratones en los días -1 y 27 del estudio (129 y 157 días de vida, respectivamente). Se realizaron mediciones de fuerza de agarre en los días 0 y 20 del estudio. Al final del estudio, el grupo de control de machos había perdido 4.3% del peso corporal que tenía el día 0 del estudio mientras que el grupo tratado había aumentado 7.8% el peso que tenía el día 0 del estudio. El grupo de control de hembras perdió 1.5% del peso corporal que tenía el día 0 del estudio y la cohorte de hembras tratada lo aumentó 15%.

Mediciones de fuerza de agarre en SOD1

	Día 0	Día 20
Control de machos	0.149 ± 0.02	0.097 ± 0.02^a
Machos tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.147 ± 0.02	$0.128 \pm 0.02^{a,b}$
Control de hembras	0.130 ± 0.02	0.091 ± 0.02^a
Hembras tratadas con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.128 ± 0.01	0.11 ± 0.02^b

Mediciones de fuerza de agarre en los días 0 y 20 en ratones SOD1 machos y hembras. El supraíndice "a" indica significativamente diferente en comparación con la medida respectiva del día 0 ($p < 0.05$). El supraíndice "b" indica una diferencia significativa entre las mediciones del grupo tratado con PBS (grupo 1) y con ActRIIB (R64 20-134)-

mFc (grupo 2) el día 20 ($p < 0.05$).

Se realizó una resonancia magnética de los ratones para determinar cambios en la composición corporal atribuidos al tratamiento. Los ratones de control machos perdieron 6.0% de la masa de tejido magro en el transcurso del estudio (día -1: $18.2 \text{ g} \pm 1.28$; día 27: $17.1 \text{ g} \pm 1.10$), los ratones machos tratados aumentaron 9.1% la masa de tejido magro respecto a la del día 0 (día -1: $19.17 \text{ g} \pm 0.77$; día 27: $20.92 \text{ g} \pm 0.74$). Los ratones de control hembras tuvieron una reducción de 0.83% de masa de tejido magro desde el inicio del estudio (día -1: $13.18 \text{ g} \pm 0.84$; día 27: $13.08 \text{ g} \pm 0.71$) y las hembras tratadas tuvieron un aumento de 10.7% en el peso corporal respecto a la del día 0 del estudio (día -1: $13.66 \text{ g} \pm 0.83$; día 27: $15.12 \text{ g} \pm 1.21$). Tanto los grupos de machos como de hembras tratados aumentaron significativamente la cantidad de tejido magro en comparación con sus respectivos grupos de control tratados con PBS ($p < 0.001$).

Efectos musculares de ActRIIB (R64 20-134)-mFc en SOD1

	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)
Control de machos	0.18 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.04
Machos tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.22 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.30 ± 0.04
Control de hembras	0.13 ± 0.02	0.089 ± 0.016	0.11 ± 0.01
Hembras tratadas con con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.17 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.15 ± 0.05

Estos datos indican que el tratamiento con ActRIIB-Fc puede ser beneficioso en el tratamiento de pacientes que tienen ALS activa, para mejorar tanto la función muscular como la calidad de vida.

Ejemplo 12: El efecto de una proteína ActRIIB-Fc sobre la adiposidad y la diabetes en ratones obesos.

Los solicitantes probaron las proteínas ActRIIB-mFc en ratones alimentados con una dieta rica en contenido de grasas (HFD) para determinar la capacidad de ActRIIB-Fc para reducir la adiposidad en un modelo de obesidad en ratón.

La diabetes tipo II es una de las principales complicaciones de la obesidad y se caracteriza por la resistencia a la insulina. Los niveles elevados de insulina en ayunas son indicativos de resistencia a la insulina y proporcionan un medio para evaluar si un animal está en un estado de resistencia a la insulina. Los solicitantes determinaron el efecto del tratamiento con ActRIIB murina (R64 K74A 20-134)-Fc para normalizar los niveles de insulina en ayunas en un modelo de obesidad en ratón.

Se mantuvieron ratones C57BL/6 alimentados con una dieta rica en contenido de grasas con una dieta compuesta por 35% de grasa, y se consideró que eran obesos cuando su peso corporal fue aproximadamente 50% mayor que el de un ratón de la misma edad alimentado con una dieta balanceada estándar (4.5% de grasa). Los ratones obesos recibieron 2 veces/semana un vehículo de control o ActRIIB humana (R64 K74A 20-134)-Fc (10 mg/kg; i.p.). Se realizó una resonancia magnética de los ratones obesos para determinar la composición corporal al comienzo de la dosificación y luego de 3 semanas de dosificación. Los cambios en la composición corporal desde el inicio se resumen en la figura 9.

Los ratones se alimentaron con una dieta rica en contenido de grasas y se consideraron obesos cuando sus pesos corporales fueron 50% superiores a los de sus contrapartes alimentados con una dieta balanceada estándar. Los ratones alimentados con una dieta rica en contenido de grasas recibieron un vehículo de control o ActRIIB murina (R64 K74A 20-134)-Fc (5 mg/kg 2 veces/semana; i.p.) durante 35 semanas. Al final del estudio, los ratones se dejaron en ayunas toda la noche. Al final del ayuno, se les extrajo sangre que se procesó para obtener el suero. Después el suero se usó para determinar los niveles de insulina en ayunas para ambas cohortes. Los resultados para el efecto de la ActRIIB murina (K74A 20-134)-Fc sobre los niveles de insulina en ayunas de los ratones obesos se resumen en la tabla siguiente.

Niveles de insulina en ayunas de ratones tratados con vehículo y ActRIIB murina (K74A 20-134)-Fc

	HFD PBS	HFD ActRIIB murina (K74A 20-134)-mFc
Promedio (ng/ml) $\pm$ desv. est.	2.27 $\pm$ 1.64	0.78 $\pm$ 0.40
Prueba t	N/A	0.012

La figura 9 muestra la menor adiposidad de la cohorte tratada con ActRIIB murina (R64 K74A 20-134)-Fc en comparación con los controles tratados con vehículo. Se encontró que los ratones tratados tenían 25.9% de disminución en la masa de grasa en comparación con sus niveles iniciales. Además, el grupo tratado aumentó la masa de tejido magro en 10.1% por encima de sus niveles iniciales. Los cambios porcentuales en la masa tanto de tejido adiposo como de tejido magro de los tratados con ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc fueron significativamente mayores que los cambios porcentuales en el grupo tratado con PBS.

En este modelo, los ratones se mantuvieron con una dieta rica en contenido de grasas hasta que fueron >50% más pesados que sus contrapartes alimentados con una dieta balanceada. Basándose en este sorprendente aumento en el peso corporal y la adiposidad, es lógico pensar que este modelo podría corresponder a los humanos que están caracterizados como mórbidamente obesos. Por lo tanto, el descubrimiento de que el tratamiento con proteína ActRIIB humana (R64 K74A 20-134)-Fc reduce la adiposidad en ratones obesos podría ser clínicamente importante para el tratamiento de seres humanos mórbidamente obesos.

Los resultados resumidos en la tabla 5 sugieren que el tratamiento con la proteína ActRIIB murina (K74A 20-134)-Fc es capaz de reducir significativamente los niveles elevados de insulina sérica en ayunas asociados a la obesidad. Este descubrimiento respalda la posible importancia clínica del uso de polipéptidos ActRIIB en el tratamiento de la diabetes tipo II.

Se realizaron otros experimentos con ActRIIB-mFc (R64 20-134) en el modelo de dieta rica en contenido de grasas (HFD) de obesidad y diabetes. Se dividieron ratones C57BL/6 de 30 semanas de vida alimentados con dieta rica en contenido de grasas en 2 grupos (PBS y 10 mg/kg de ActRIIB-mFc (R64 20-134)). Los ratones se pesaron y se dosificaron 2X/semana intraperitonealmente durante 12 semanas. Los ratones se evaluaron por resonancia magnética en los días 0 y 94 del estudio.

Los ratones tratados perdieron 1.9% de sus pesos corporales respecto a los del día 0 del estudio mientras que los ratones tratados con PBS aumentaron 6.7% sus pesos corporales durante el estudio. Los ratones tratados también ganaron significativamente más tejido magro que el grupo tratado con PBS (21.1% $\pm$ 6.28 versus 3.7% $\pm$ 4.08) durante el estudio. Los ratones tratados también perdieron considerable tejido graso (-34% $\pm$ 10.95) en comparación con el grupo del PBS (+10.2 $\pm$ 10.18). Los pesos musculares individuales también aumentaron en el grupo tratado con ActRIIB-mFc (R64 20-134).

	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pecs (L+R)	
PBS	0.33 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.05	
ActRIIB-mFc (R64 20-134)	0.44 $\pm$ 0.08*	0.25 $\pm$ 0.02*	0.44 $\pm$ 0.13*	
				* p<0.05

Además de los efectos beneficiosos sobre la grasa y el músculo asociados al tratamiento con ActRIIB-Fc en estos ratones, se observaron efectos positivos sobre los lípidos séricos. Los niveles séricos tanto de colesterol como de triglicéridos se redujeron notablemente, lo que sugiere que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc se pueden usar para reducir los niveles de estos lípidos en los pacientes.

Ejemplo 13: El efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones caquécticos.

Los solicitantes analizaron la capacidad de ActRIIB (R64 20-134)-mFc para atenuar la pérdida muscular en un modelo de atrofia muscular progresiva inducida por glucocorticoides en ratón.

A los ratones se les administró por vía subcutánea diariamente durante 13 días PBS o dexametasona (2 mg/kg) para inducir atrofia muscular progresiva. En los mismos 13 días, los grupos tratados con PBS y dexametasona recibieron vehículo o ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg; i.p.; 2 veces/semana) de modo que se representaron todas las combinaciones de tratamiento. Se realizó una resonancia magnética de los ratones en los días 0 y 13 para determinar cambios en la masa del tejido magro entre los grupos. Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Masa de tejido magro de ratones tratados con vehículo y ActRIIB murina (R64 20-134)-Fc

Grupo (tratamiento sc:ip)	Promedio de magro día 13- promedio de magro día 0 (g) $\pm$ desv. est.
PBS:PBS	0.83 $\pm$ 0.94
Dexamet:PBS	0.47 $\pm$ 0.34 ^a
Dexamet:ActRIIB	2.56 $\pm$ 0.37 ^{a,b}
PBS:ActRIIB	3.63 $\pm$ 0.62 ^a
^a Diferencia significativa comparada con PBS:PBS a $p < 0.05$	
^b Diferencia significativa comparada con Dexamet:PBS a $p < 0.05$	

La resonancia magnética mostró una disminución significativa de 2.5% en la masa de tejido magro en el grupo de dexametasona:PBS comparado con la cohorte de PBS:PBS. En contraste, el grupo de dexametasona:ActRIIB (R64 20-134)-mFc mostró un aumento de 13.5% en la masa de tejido magro, un aumento significativo cuando se compara tanto con los grupos de PBS:PBS como de dexametasona:PBS. La caquexia es un efecto secundario indeseable de diversos tratamientos terapéuticos, que incluyen el tratamiento crónico con glucocorticoides. Por lo tanto, podría ser de importancia clínica que el tratamiento con una proteína ActRIIB humana (R64 20-134)-mFc pueda atenuar la atrofia muscular progresiva asociada a caquexia.

Ejemplo 14: El efecto de ActRIIB-Fc sobre la masa muscular y la obesidad en ratones viejos u ovariectomizados

La sarcopenia es una forma de pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento en los seres humanos por lo demás sanos. El trastorno se asocia a una pérdida progresiva de masa de músculo esquelético y a un deterioro de la fuerza y la movilidad. Las causas de la sarcopenia no se conocen bien. En las mujeres, la menopausia acelera la pérdida de masa muscular, tanto como lo hace con respecto a la pérdida de masa ósea. Concordantemente, se probó ActRIIB (R64, 20-134)-mFc en ratones extremadamente viejos (dos años de vida) y en ratones ovariectomizados (un modelo de estado posmenopáusico).

Se ovariectomizaron (OVX) o pseudo operaron ratonas C57BL/6 de 8 semanas de vida, después se las dejó envejecer durante 16 semanas antes del inicio del estudio. Al comienzo del estudio, las ratonas OVX y las pseudo operadas se dividieron en sendos grupos de tratamiento y vehículo. Todos los grupos se pesaron y recibieron semanalmente ActRIIB (R64, 20-134)-mFc o tampón de control durante 11 semanas. Se realizó una resonancia magnética de todas las ratonas los días 0 y 83 para determinar la composición corporal.

Al final del estudio, las ratonas pseudo operadas que recibieron PBS habían perdido 4.7% de su masa magra original mientras que el grupo de pseudo operadas tratado, aumentó su masa magra en 21% en el transcurso del estudio. Los controles OVX perdieron 12.1% (significativamente más que el grupo de las pseudo operadas que recibió vehículo) de su masa magra mientras que las ratonas OVX tratadas ganaron 12.9% hacia el final del estudio.

Estos datos indican que se pueden usar las proteínas de fusión ActRIIB-Fc para contrarrestar la pérdida de masa muscular que es común en las mujeres posmenopáusicas.

Para evaluar los efectos de ActRIIB-Fc en una población naturalmente senescente, se dejó envejecer a ratones C57BL/6 machos durante 70 semanas antes del comienzo del tratamiento. Los ratones se dividieron en 2 grupos (PBS y 10 mg/kg de ActRIIB (R64, 20-134)-mFc. Cada grupo se pesó y se dosificó 2X/semana durante 10 semanas. En el transcurso del estudio, los grupos tratados ganaron significativamente más masa de tejido magro que el grupo del PBS.

% de cambio de masa magra	PBS	10 mg/kg
Promedio (% desde el inicio)	101.76	117.27
Desviación estándar	3.83	3.91
Valor p para PBS		<0.001

El grupo tratado también tuvo pesos musculares individuales significativamente más altos en comparación con los ratones que recibieron PBS.

Pesos musculares	Gemelos (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	
PBS	0.283 ± 0.07	0.156 ± 0.01	0.241 ± 0.07	
ActRIIB (R64, 20-134)-mFc	0.371 ± 0.03*	0.192 ± 0.021*	0.330 ± 0.05*	* p<0.05

La integridad muscular en la cohorte tratada también pareció ser mayor que la del grupo del PBS, así como al parecer se redujo la grasa intramuscular y mejoró la citoarquitectura. (Véase Figura 10).

Estos datos demuestran que se pueden utilizar las proteínas de fusión ActRIIB-Fc para tratar la atrofia muscular progresiva asociada al envejecimiento en hombres y mujeres.

Ejemplo 15: El efecto de ActRIIB-Fc sobre la pérdida de masa muscular asociada a la castración

El cáncer de próstata se trata comúnmente con terapia antiandrogénica. Los efectos secundarios del tratamiento incluyen la pérdida de masa muscular y el aumento de la obesidad. Los ratones castrados experimentan cambios similares, haciendo de este un buen modelo para el estudio del potencial de ActRIIB-Fc para ser utilizada en este escenario clínico.

Se castraron o pseudo operaron ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de vida y después se permitió que se recuperaran durante 3 semanas antes del comienzo del estudio. Los grupos castrados y pseudo operados se subdividieron después en grupos de PBS y ActRIIB (R64, 20-134)-mFc (10 mg/kg). Los ratones se pesaron y se dosificaron por vía subcutánea una vez/semana durante 12 semanas. Los ratones se evaluaron por resonancia magnética en los días 0 y 83 del estudio.

En el transcurso del estudio, los ratones pseudo operados tratados con PBS ganaron un promedio de $9.72\% \pm 3.67$ y los ratones pseudo operados tratados con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc ganaron $35.79\% \pm 3.1$ de masa de tejido magro respecto a la del día 0 del estudio. Los ratones castrados tratados con PBS perdieron $8.1\% \pm 4.22$ de la masa de tejido magro que tenían el día 0 mientras que los ratones castrados tratados ganaron $17.77\% \pm 3.86$. Además, la castración conduce a mayor adiposidad, pero el tratamiento con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc ayudó a reducir la magnitud del aumento de la masa grasa.

Los músculos gemelos y pectorales de los ratones castrados tratados con vehículo fueron más pequeños que los de los ratones pseudo operados tratados con PBS (gemelos castrados: 0.275 ± 0.03 g, pects castrados: 0.196 ± 0.06 g; gemelos, pseudo op.: 0.313 ± 0.02 g, pects pseudo op.: 0.254 ± 0.03 g). El tratamiento con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc atenúa significativamente esta disminución en los pesos musculares inducida por la castración (gemelos castrados: 0.421 ± 0.03 g, pects castrados: 0.296 ± 0.06 g).

Ejemplo 16: Efectos de ActRIIB-Fc en la caquexia del cáncer

Muchos tumores se asocian a pérdida de apetito y pérdida de masa muscular severa. Los pacientes que presentan caquexia tienen un peor pronóstico que los pacientes no caquéticos. La línea celular de cáncer de colon CT26 induce caquexia profunda en ratones. Se analizaron los efectos de ActRIIB (R64 20-134) en este modelo sobre la caquexia inducida por xenoinjerto.

Se usaron seis grupos de ratones en el experimento, de la manera siguiente:

Grupo	Tumores	Tratamiento	Dosis	Paradigma
1	N	VEH	v/v	Terapéutico
2	N	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapéutico
3	Y	VEH	v/v	Terapéutico
4	Y	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapéutico
5	Y	ActRIIB-Fc	30 mg/kg	Terapéutico
6	Y	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Preventivo

Los grupos 3 a 6 recibieron 5×10^6 células tumorales por vía subcutánea. El grupo 6 comenzó el tratamiento inmediatamente con ActRIIB-Fc dos veces por semana. Los grupos 1 a 5 comenzaron la dosificación el día 28 del estudio cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 300 a 500 mm³. Como se muestra en la figura 11, ActRIIB-Fc disminuyó notablemente la pérdida de masa muscular asociada a tumores CT26, tanto en ratones con tumores establecidos como cuando se utilizó en un modelo preventivo antes de la introducción del tumor.

Ejemplo 17: El efecto de las variantes de ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones silvestres.

Este estudio mostró los efectos de los constructos Fc relacionados con ActRIIB siguientes sobre la masa muscular y otros tejidos en ratones C57BL/6 machos de 6 semanas de vida. Los ratones se pesaron y se les inyectó por vía intraperitoneal, quincenalmente PBS o constructos Fc relacionadas con ActRIIB (10 mg/kg):

ActRIIB (R64 20-134)-Fc

ActRIIB (L79D 20-134)-Fc

ActRIIB (L79E 20-134)-Fc

ActRIIB (A24N 20-134)-Fc

ActRIIB (R64K 20-134)-Fc

Se realizó una resonancia magnética de los ratones al comienzo, en la mitad y al final del estudio. Los músculos femorales, pectorales, gemelos y el hígado, los riñones y el bazo se pesaron y guardaron en formalina.

Un análisis inicial de los datos indica que ActRIIB (R64 20-134)-Fc provoca el mayor incremento en la masa muscular y la masa corporal magra, y también tiene el máximo efecto sobre otros tejidos. Las variantes L79D y L79E aumentan la masa muscular en menor grado, y tienen poco efecto sobre otros tejidos. Los constructos A24N y R64K tienen un efecto intermedio sobre los músculos y otros tejidos. Estos datos confirman que las variantes de ActRIIB con menor actividad de unión a activina tienen propiedades deseables, particularmente un efecto selectivo sobre el tejido muscular.

Si bien se han tratado las realizaciones específicas del tema, la memoria antedicha es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones se tornarán evidentes para los expertos en el área luego de la revisión de esta memoria y las reivindicaciones siguientes. El alcance total de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones y la memoria.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ACCELERON PHARMA INC.
<120> VARIANTES DERIVADAS DE ACTRIIB Y SUS USOS
<130> P47899EP1/NJL
<140>

<141> 2008-02-04
<150> 60/899,304

<151> 2007-02-02
<150> 60/927,088

<151> 2007-05-01
<150> 60/931,880

<151> 2007-05-25
<160> 25
<170> PatentIn Ver. 3.3
<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 1

ES 2 488 854 T3

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

<210> 2

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp

ES 2 488 854 T3

1	5	10	15
Pro 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
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
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
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
Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val	325	330	335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340 345 350
Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355 360 365
Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370 375 380
Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
385 390 395 400
Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415
Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430
His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445
Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450 455 460
Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
465 470 475 480
Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
485 490 495
Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
500 505 510

<210> 3

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

tctgggctgt gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgccaa ctgggagctg 60
gagcgaccca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120
tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180
ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccactgagga gaacccccag 240
gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca ttgcccagag 300
gctggggggc cggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc 348

<210> 4

<211> 1539

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgtgtgtggc cggctctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gactgctac 180
gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggtgac 300
ttctgtgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatattgc agaggctggg 360
ggcccggag tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420
tactactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480
cggcatcgca agcccccta cggtcattgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

```

ccatccccctc tgggtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggggcgc 600
tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtgggtca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacggg acaggtaggc 1080
acgagacggg acatggctcc tgagggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200
aagggtgcag acggaccctg ggatgagtac atgtgccctt ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttctg tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagctttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380
tgggaccatg atgcagaggg tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggg cggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

<210> 5

<211> 343

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 5

```

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

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

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
      35          40          45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50          55          60

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

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
      85          90          95

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

Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
      115          120          125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
      130          135          140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
      145          150          155          160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
      165          170          175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

```

15

ES 2 488 854 T3

	180		185		190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	195		200		205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	210		215		220
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	225		230		235
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		245		250	255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		260		265	270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		275		280	285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		290		295	300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		305		310	315
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		325		330	335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		340			

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 7

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

<220>

<223> Descripción del organismo desconocido: Activador tisular del plasminógeno
<400> 8

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
20

5 <210> 9

<211> 20

<212> PRT

10

<213> Organismo desconocido

<220>

<223> Descripción del organismo desconocido: Péptido nativo

15 <400> 9

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala
20

<210> 10

20 <211> 1107

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 10

```
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcatcta ctacaacgcc 120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180
aagcggctgc actgctacgc ctccctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240
aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360
catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc 420
ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 540
acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaacccat ctccaaagcc 780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
tccgacggct cttctctcct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107
```

30

<210> 11

<211> 6

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 11

Gly Arg Gly Glu Ala Glu
1 5
<210> 12

5 <211> 344
<212> PRT

<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
<400> 12

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

15 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

210	215	220
Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
225	230	235 240
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
	245	250 255
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	260	265 270
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	275	280 285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
	290	295 300
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
305	310	315 320
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	325	330 335
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	340	

<210> 13

<211> 225

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<220>

<221> MOD_RES

15

<222> (43)

<223> Asp o Ala

<220>

20

<221> MOD_RES

<222> (100)

25

<223> Lys o Ala

<220>

<221> MOD_RES

30

<222> (212)

<223> Asn o Ala

<400> 13

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

- 5 Lys
 225
 <210> 14
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 14
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 15
 20 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: 6xHis tag sintética
<400> 15

His His His His His His
1 5

5 <210> 16

<211> 368

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial
<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
<400> 16

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

275						280						285					
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
290						295						300					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
305						310						315					
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
320						325						330					
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		
335						340						345					
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
350						355						360					
355						360						365					

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

[illegible]

<210> 18

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn
1				5					10					15	
Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly
			20					25					30		
Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Ser
		35					40					45			

ES 2 488 854 T3

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Ala Pro Thr
 115

<210> 19

<211> 150

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 19

Met Thr Ala Pro Trp Ala 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 Pro
 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 Pro 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
 145 150

<210> 20

<211> 150

<212> PRT

<213> Sus sp.

<400> 20

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

Val 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
145 150
<210> 21

<211> 150

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

Met Thr Ala Pro Trp Ala 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 Pro 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

145 150
<210> 22

<211> 150

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens
<400> 22

```

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
145          150

```

<210> 23

10

<211> 150

<212> PRT

15 <213> Bos sp.
<400> 23

```

Met Thr Ala Pro Trp Ala 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 Arg 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

```

20

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 Val Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 24

<211> 150

<212> PRT

<213> Xenopus sp.

<400> 24

Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Ala Thr Phe
1 5 10 15

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

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
35 40 45

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

Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
65 70 75 80

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
85 90 95

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

Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro
115 120 125

Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro
130 135 140

Ile Val Gly Leu Ser Met
145 150

<210> 25

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
20 25 30

ES 2 488 854 T3

[illegible]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de la proteína ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 29 a 109 de SEC. ID N°: 2, en la cual la proteína comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEC. ID N°: 2.
2. La variante de la proteína ActRIIB de la reivindicación 1, en la cual la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, 97%, 98% o 99 % idéntica a los aminoácidos 29 a 109 de SEC. ID N°: 2.
- 10 3. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la proteína comprende un R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de SEC. ID N°: 2.
- 15 4. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la proteína comprende un D o E en la posición correspondiente a la posición 79 de SEC. ID N°: 2.
- 20 5. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 22 a 25 de SEC. ID N°: 2 y termina en un aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 131, 133 o 134 de SEC. ID N°: 2.
- 25 6. La variante de la proteína ActRIIB de la reivindicación 5, en la cual la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 25 de SEC. ID N°: 2 y termina en el aminoácido 131 de SEC. ID N°: 2.
7. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la proteína es un homodímero.
8. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga.
- 30 9. La variante de la proteína ActRIIB de la reivindicación 8, en la cual la porción heteróloga comprende una región constante de una cadena pesada de IgG.
- 35 10. La variante de la proteína ActRIIB de la reivindicación 9, en la cual la porción heteróloga comprende un dominio Fc.
- 40 11. La variante de la proteína ActRIIB de la reivindicación 10, en la cual la proteína de fusión comprende además un dominio conector ubicado entre el polipéptido ActRIIB y el dominio Fc.
12. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la proteína incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados elegidos entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y un aminoácido conjugado a una porción lipídica.
- 45 13. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la cual la proteína comprende además una secuencia de purificación elegida entre: un epítipo marcador, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST.
- 50 14. La variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la cual la variante de la proteína ActRIIB inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo celular.
15. Una composición farmacéutica que comprende la variante de la proteína ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Secuencia del polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) designado como SEC.
ID N°: 1 (116 aa).

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GC

WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

Figura 1

Secuencia del precursor de ActRIIB humano designada como SEC. ID N°: 2 (NM_001106, 512 aa).

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRL
HC

YASWRN¹SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PE

AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHED
PG

PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIF
ST

PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAET
MS

RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEFGKPP
GD

THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYM
LP

FEEEIGQHPSLEELQEVDVHKKMRPTIKDHWLKHGGLAQLCVTIEECWDHDAEARLS
AG

CVEERVSLIRRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Figura 2

Secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB soluble (extracelular) humano, designada como SEC. ID N°: 3 (348 bp).

```
tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcacc  
aaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgc  
aacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgatagg  
caggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaac  
gagcgcttcactcatttgccagaggctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagcccc  
acc
```

Figura 3

Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEC. ID N°: 4 (nucleótidos 5-1543 de NM_001106, 1539 bp)

```
atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtctgggcgtggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgaccaaccagagcggcctg
gagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaagggtgctggttagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcc
actgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttctactcat
ttgccagaggctggggggcccggaagtacgtacgagccacccccgacagccccaccctgctcacgggtg
ctggcctactcactgctgcccacgggggcttctccctcatcgctcctgctggccttttggatgtaccgg
catcgcaagccccctacgggtcatgtggacatccatgaggacctgggcctccaccaccatcccctctg
gtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttcccactccaggacaagcagtcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcattgctgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgcccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcga
tttgagccagggaaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacgagacgggtacatggctcctgag
gtgctcgaggagccatcaacttcagagagatgccttcctgcgcattgacatgtatgccatgggggtg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggacccgtggatgagtacatgctgcccttt
gaggaagagattggccagcacccttcgttggaggagctgcaggaggtgggtgggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcactggttgaaacacccgggctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgc
tgggacatgatgcagaggctcgcttgtccggggctgtgtggaggagcgggtgtccctgattcgaggg
tcggtcaacggcactacctcggaactgtctcgtttccctggtgacctctgtcaccaatgtggacctgccc
cctaaagagtcaagcatctaa
```

Figura 4

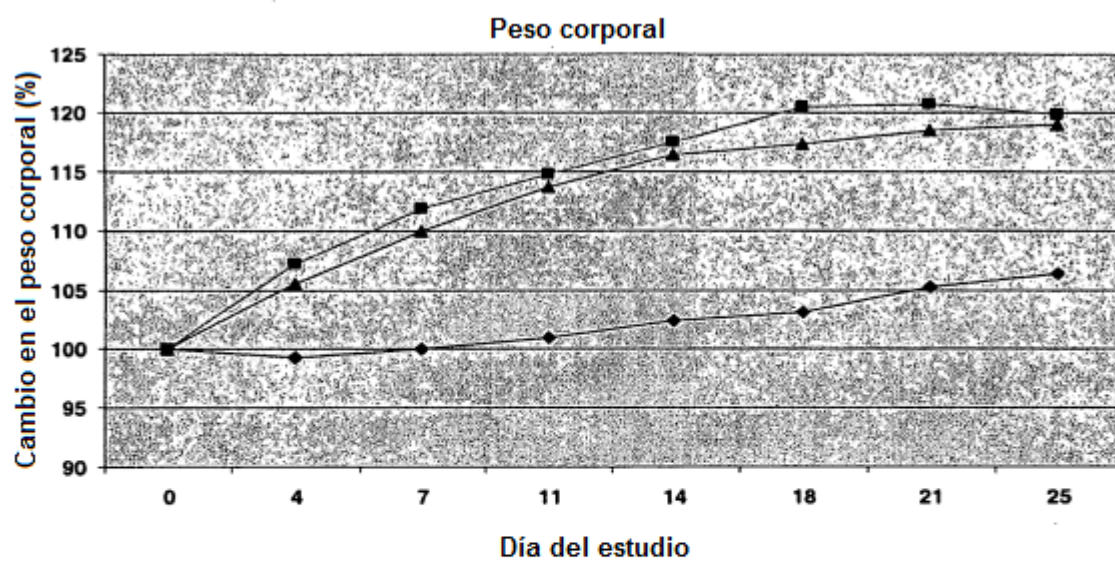


Figura 5

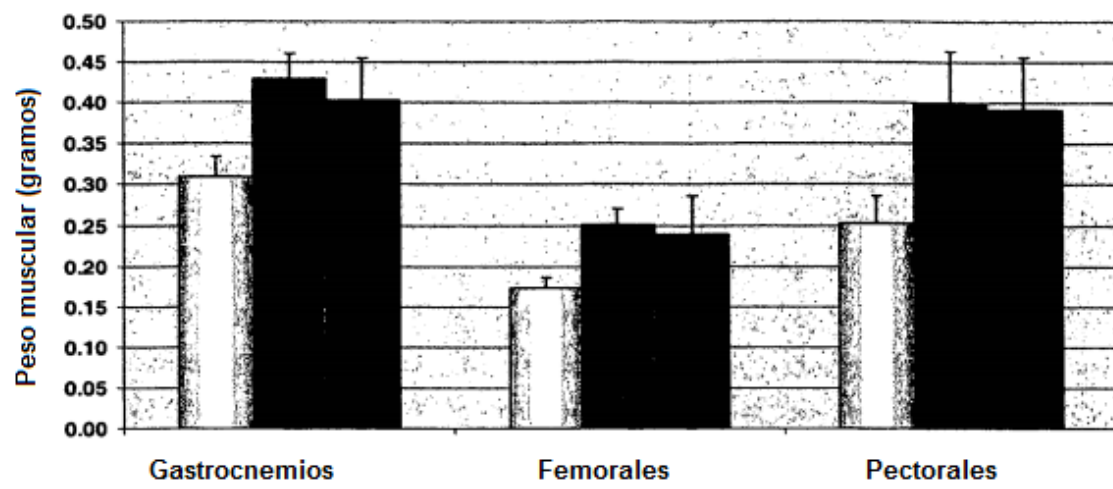


Figura 6

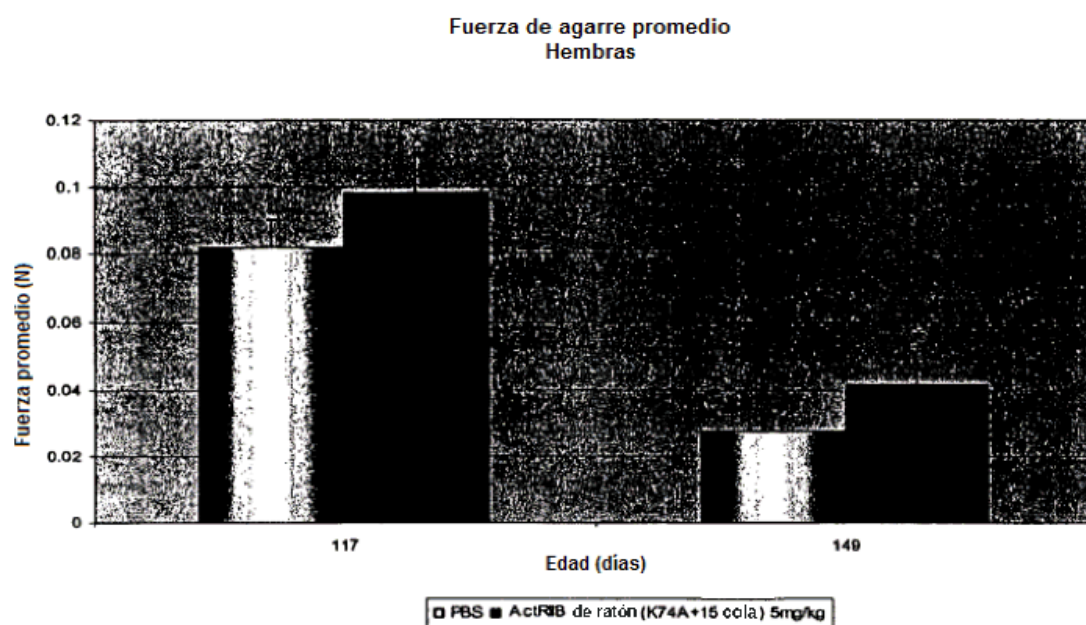


Figura 7

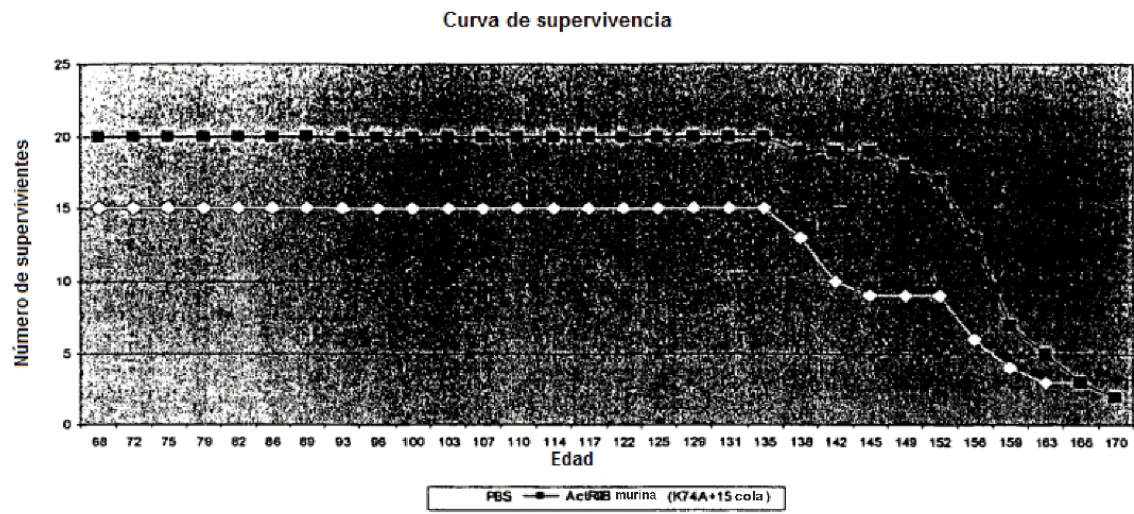


Figura 8

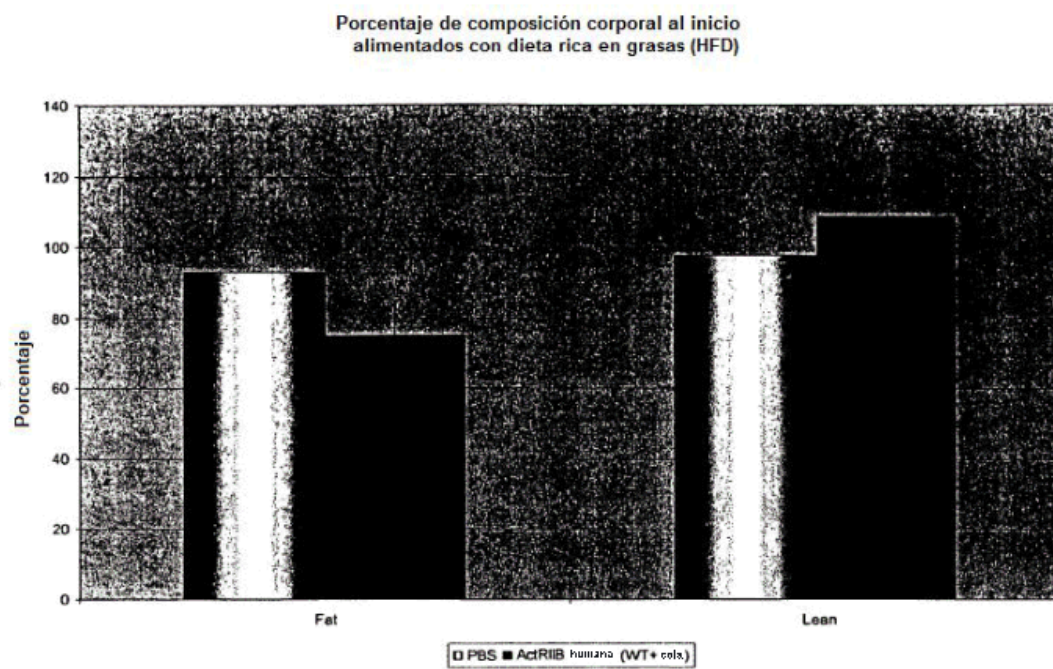


Figura 9

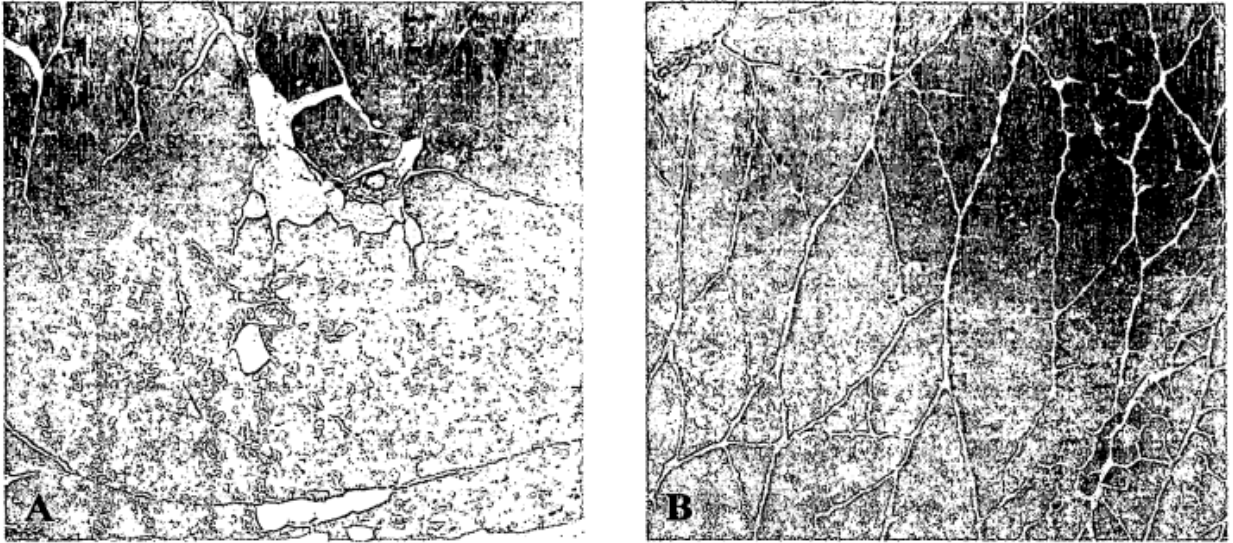


Figura 10

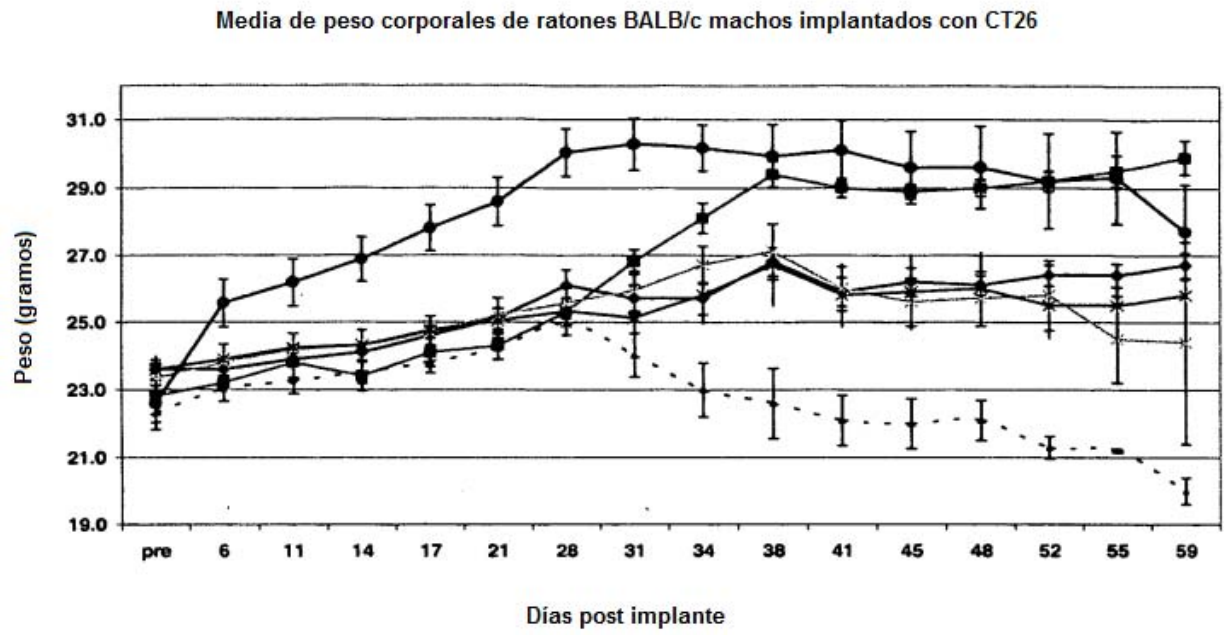


Figura 11

ActRIIa	ILGRSETQEC	LEFNANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTNQSGLERC	EGEQDKRLHC	YASWRNSSGT

IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVERKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPPEM
IELVKKGCWL	DDFNICYDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV	TPKPPT
GGPEVTYEPP	PTAPT

Figura 12

Rata Iib	ITAPWAA	-	LALLWGS	LCAGSGRG	GAETRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGEQ	DKR
Cerdo Iib	ITAPWAA	-	LALLWGS	LCVSGRG	GAETRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGEQ	DKR
Ratón Iib	ITAPWAA	-	LALLWGS	LCAGSGRG	GAETRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGEQ	DKR
Humano Iib	ITAPWVA	-	LALLWGS	LCAGSGRG	GAETRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGEQ	DKR
Bovino Iib	MTAPWAA	-	LALLWGS	LCAGSGRG	GAETRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGER	DKR
Xenopus Iib	MGASVAL	TFLLL	LATFRA	GSGHDE	VEETRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGER	DKR
Humano IIA	MGAALAKL	AFVFL	ISCS	SGAILGR	SETECL	FFNANW	ELERTNQ	SGLER	-	CEGER	DKR
Consenso	MTAPWaa	XIa	ILWgs	LCaGsg	Rfqa	ELTRE	CIYYNANW	ELERTNQ	SGLER	LCeGq	DKR

Rata Iib	LHCVASW	PNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT
Cerdo Iib	LHCVASW	NRNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT
Ratón Iib	LHCVASW	NRNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT
Humano Iib	LHCVASW	NRNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT
Bovino Iib	LHCVASW	NRNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT
Xenopus Iib	LHCVASW	NRNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT
Humano IIA	RHCFA	YWKNI	SGSIE	IVKQGC	WLDDI	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC
Consenso	LHCVASW	NRNSSGT	IELVKKGC	WLDDF	NCYDOR	QECVAT	EEENPQ	VVFC	CC	EGNFC	NERFT

Rata Iib	HLPEAGG	PEVTVEP	-	PPPTA	PTLLT	VLAYS	LLP	IGGLS	-
Cerdo Iib	HLPEAGG	PEVTVEP	-	PPPTA	PTLLT	VLAYS	LLP	IGGLS	-
Ratón Iib	HLPEAGG	PEVTVEP	-	PPPTA	PTLLT	VLAYS	LLP	IGGLS	-
Humano Iib	HLPEAGG	PEVTVEP	-	PPPTA	PTLLT	VLAYS	LLP	IGGLS	-
Bovino Iib	HLPEAGG	PEVTVEP	-	PPPTA	PTLLT	VLAYS	LLP	IGGLS	-
Xenopus Iib	HLPEV	-	-	ETFD	KPQ	SASV	LNIL	IVS	LLP
Humano IIA	VFPEME	VTQPT	SNP	-	VTPK	PPVY	NIL	IVS	LLP
Consenso	HLPEX	gqpe	VTye	PKpp	ctat	ctVL	aYS	LI	Pig

Figura 13