

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 934**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 14/71** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 14/72** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2008 E 14175663 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2805967**

54 Título: **Variantes procedentes 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:  
**27.10.2016**

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 2 587 934 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 procedentes de ActRIIB y sus usos

## 5 Antecedentes de la invención

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y en la especificación tisular y pueden influir sobre una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación celular epitelial. 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, suele ser posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas piamontesa y azul belga de ganado vacuno portan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que causa un marcado aumento de la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997,17(1):71-4. Además, en seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 se asocian con masa muscular aumentada y, según se ha publicado, con una fuerza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Los cambios en músculo, hueso, cartílago y otros tejidos pueden lograrse mediante señalización agonista o antagonista que está mediada por un miembro apropiado de la familia TGG-beta. Por tanto, existe una necesidad de agentes que funcionen como reguladores potentes de la señalización de TGF-beta.

## 25 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína ActRIIB variante para su uso para promover formación de hueso, promover formación de cartílago, aumentar la mineralización ósea, el tratamiento de la osteoporosis, el tratamiento de fracturas óseas, el tratamiento de defectos del cartílago, o el tratamiento la densidad ósea baja, en la que la proteína ActRIIB variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, en la que la proteína comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 70 de la SEQ ID NO: 2.

Opcionalmente, la proteína comprende una R o una K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la proteína comprende una D o una E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que empieza en el resto de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 22-25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en un aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 131, 133, o 134 de la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que empieza en el aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en el aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 2.

Opcionalmente, la proteína es un homodímero. Opcionalmente, la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga. Opcionalmente, la porción heteróloga comprende una región constante de cadena pesada de una IgG. Opcionalmente, la porción heteróloga comprende un dominio Fc.

Opcionalmente, la proteína de fusión comprende además un dominio enlazador situado entre el polipéptido ActRIIB y el dominio Fc. Opcionalmente, la proteína incluye uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados de entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y un aminoácido conjugado con un resto lipídico. Opcionalmente, la proteína comprende además una secuencia de purificación seleccionada de entre: un marcador de epítipo, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, la proteína ActRIIB variante inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células.

En otro aspecto, la invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende un polipéptido ActRIIB variante útil en el primer aspecto de la invención.

Opcionalmente, el polipéptido ActRIIB soluble 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, el polipéptido ActRIIB soluble inhibe la señalización de ActRIIB, tal como los eventos de transducción de señales desencadenados por un ligando de ActRIIB. Una proteína ActRIIB variante útil de la invención incluye una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (p. ej., en el dominio de unión a 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 una célula de mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica de los polipéptidos en relación con el polipéptido ActRIIB de origen natural. Una proteína ActRIIB variante puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, una proteína ActRIIB y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, dirección hacia tejidos particulares, etc. Por

ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos de proteína, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Una proteína de fusión ActRIIB variante puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (natural o mutante) o una seroalbúmina. En ciertas realizaciones, una proteína de fusión ActRIIB-Fc comprende un enlazador relativamente desestructurado situado entre el dominio Fc y el dominio ActRIIB extracelular. Este enlazador 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 de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que está relativamente libre de estructura secundaria. Un enlazador puede ser rico en restos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias de repetición de treonina/serina y glicinas (p. ej., repeticiones de TG<sub>4</sub> o SG<sub>4</sub>). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un marcador de epítipo, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB soluble incluye uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados de entre: un aminoácido glucosilado un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado un aminoácido conjugado con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado con ActRIIB. Preferentemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógeno. En general, es preferible que una proteína ActRIIB se exprese en una línea celular de mamífero que medie glucosilación natural adecuada de la proteína ActRIIB para reducir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han usado con éxito líneas celulares humanas y de CHO y se espera que sean útiles otros vectores de expresión de mamífero comunes. La proteína ActRIIB variante en la proteína de fusión ActRIIB puede inhibir la señalización por miostatina y/o GDF-11 en un ensayo basado en células.

En el presente documento se desvelan productos farmacéuticos empaquetados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en el presente documento y marcada para su uso para promover el crecimiento de un tejido o reducir o prevenir una pérdida de tejido en un ser humano. Los tejidos de ejemplo incluyen hueso, cartílago, músculo, grasa y tejido neuronal.

La invención proporciona proteínas ActRIIB variantes para su uso en ciertas afecciones médicas que comprenden un dominio de unión a ligando (p. ej., unión a GDF8) alterado. Dichos dominios de unión a ligando alterados de un receptor ActRIIB comprenden un aminoácido ácido en la posición 79 y pueden comprender además una o más mutaciones en restos de aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es relativas a la SEQ ID NO:2). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada por un ligando tal como GDF8/GDF11 en relación con un dominio de unión a ligando natural de un receptor ActRIIB. A modo de ilustración, en el presente documento se demuestra que estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado por GDF11 (y por tanto, presumiblemente, GDF8) por encima de la activina (presentada con respecto a ActRIIB): K74Y, K74F, K74I y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto inverso, aumentando la proporción de unión de activina por encima de GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) puede aumentarse mediante la inclusión de una región de "cola" o, presumiblemente, una región enlazadora desestructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que causaron un descenso global en la afinidad de unión a ligando incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones pueden combinarse para lograr efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan a la proporción de GDF11:activina tienen un efecto global negativo sobre la unión a ligando y, por tanto, éstas pueden combinarse con mutaciones que aumentan generalmente la unión a ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando.

Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con una CI<sub>50</sub> al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la CI<sub>50</sub> para inhibir activina. Estos polipéptidos ActRIIB solubles pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (bien natural, o bien mutante). En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB solubles objeto son antagonistas (inhibidores) de GDF8/GDF11.

Se contemplan otras variantes de ActRIIB, tales como las siguientes: Una proteína de fusión ActRIIB variante que comprende una porción procedente de la secuencia de ActRIIB de SEQ ID NO: 2 y una segunda porción de polipéptido, en la que la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 2 (empezando opcionalmente en 22-25 de la SEQ ID NO: 2) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 2. La porción procedente de ActRIIB puede corresponder a (a) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 2 (empezando opcionalmente en 22-25 de la SEQ ID NO: 2) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 2 (empezando opcionalmente en 22-25 de la SEQ ID NO: 2) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 2; (d) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 2; (e) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 2; (f) una secuencia que empieza en

cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 2; (g) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 2; (h) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 2; (i) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 2; (j) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de la SEQ ID NO: 2; o (k) una secuencia que empieza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 2 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 2; Sorprendentemente, las construcciones que empiezan en 22-25 de la SEQ ID NO: 2 tienen niveles de actividad mayores que los de las proteínas que tienen el dominio extracelular completo del ActRIIB humano. Cualquiera de las proteínas de fusión ActRIIB variantes anteriores puede producirse como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión ActRIIB anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de cadena pesada de una IgG, tal como un dominio Fc.

Una proteína ActRIIB variante de la invención puede tener una R o una K en la posición correspondiente a la 64 de la SEQ ID

NO: 2. Al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 2 puede situarse fuera del bolsillo de unión a ligando, una alteración conservativa situarse dentro del bolsillo de unión a ligando, o una alteración en una o más de las posiciones seleccionarse del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55 y F82. La proteína ActRIIB variante puede comprender al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de la de una secuencia N-X-S/T endógena de ActRIIB y en una posición fuera del bolsillo de unión a ligando.

La proteína ActRIIB variante puede comprender una N en la posición correspondiente a la posición 24 de la SEQ ID NO: 2 y una S o una T en la posición correspondiente a la posición 26 de la SEQ ID NO: 2. La proteína ActRIIB variante puede ser una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga. Cualquiera de las proteínas de fusión ActRIIB variantes anteriores puede producirse como un homodímero.

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

En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIB soluble, que no codifican un polipéptido ActRIIB completo. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante de un polipéptido ActRIIB soluble. Tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (p. ej., dominio de unión a ligando) de un ActRIIB y una secuencia que codificaría una parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplásmico de un ActRIIB, pero un codón de terminación situado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplásmico, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótido de ActRIIB de longitud completa tal como la SEQ ID NO: 4, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o situado de otra forma de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente con una porción truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos que se desvelan en el presente documento pueden estar 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 tal como una célula CHO.

También se desvelan en el presente documento métodos para fabricar un polipéptido ActRIIB soluble. Dicho método puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (p. ej., la SEQ ID NO: 3) que se desvelan en el presente documento en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIB soluble, en el que dicha célula se transforma con una construcción de expresión de ActRIIB soluble; y b) recuperar el ActRIIB soluble así expresado. Los polipéptidos ActRIIB solubles pueden recuperarse como fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteína a partir de cultivos celulares.

Un polipéptido ActRIIB soluble desvelado en el presente documento puede usarse en un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado con pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente. Dichos trastornos incluyen atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y un trastorno de atrofia muscular progresiva caquexia, anorexia, síndrome de DMD síndrome de DMB síndrome de emaciación por SIDA, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares, enfermedades de las motoneuronas, enfermedades de la unión neuromuscular y miopatías inflamatorias). Un método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

Un polipéptido ActRIIB soluble desvelado en el presente documento puede usarse en un método para disminuir el contenido de grasa corporal o reducir la velocidad de incremento del contenido de grasa corporal y para tratar un trastorno asociado con ganancia peso corporal indeseable, tal como obesidad, diabetes mellitus no

insulinodependiente (DMNID), enfermedad cardiovascular, cáncer, hipertensión, artrosis, ictus, problemas respiratorios y colecistopatía. Estos métodos pueden comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

5 Un polipéptido ActRIIB soluble desvelado en el presente documento puede usarse en un método para tratar un trastorno asociado con actividad anómala de GDF8. Dichos trastornos incluyen trastornos metabólicos tales como diabetes de tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (p. ej., síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por traumatismo (p. ej., quemaduras o desequilibrio del nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (p. ej., obesidad); distrofia muscular (incluyendo la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA);  
10 atrofia muscular; atrofia orgánica; debilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; sarcopenia, caquexia y otros síndromes de atrofia muscular progresiva; osteoporosis; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; artrosis; fracturas relacionadas con osteoporosis; masa ósea baja debida a glucocorticoterapia crónica, insuficiencia gonadal precoz, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. El método puede comprender  
15 administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

En el presente documento se desvela un método para identificar un agente que estimula el crecimiento de un tejido tal como hueso, cartilago, músculo y grasa. El método comprende: a) identificar un agente de ensayo que se una a un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActRIIB de forma competitiva con un polipéptido ActRIIB soluble; y  
20 b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento del tejido.

También se desvelan en el presente documento métodos para antagonizar la actividad de un polipéptido ActRIIB o de un ligando de ActRIIB (p. ej., GDF8, GDF11, activina, BMP7, y Nodal) en una célula. Estos métodos comprenden poner en contacto la célula con un polipéptido ActRIIB soluble. Opcionalmente, La actividad del polipéptido ActRIIB o el ligando de ActRIIB se supervisa mediante una transducción de señales mediada por el complejo ActRIIB/ligando de ActRIIB, por ejemplo, supervisando la proliferación celular. Las células de los métodos incluyen un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adipocito y una célula muscular.  
25

También se desvelan usos de un polipéptido ActRIIB soluble para hacer un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección tal como se describe en el presente documento.  
30

#### Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra una secuencia de polipéptido ActRIIB soluble humano (extracelular) (SEQ ID NO: 1). La "cola" C-terminal está subrayada.

La figura 2 muestra la secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2). El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en negrita (también denominado como SEQ ID NO: 1); y los sitios de glucosilación unidos a N potenciales están recuadrados.  
40

La figura 3 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB soluble humano (extracelular), designada como SEQ ID NO: 3.

45 La figura 4 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEQ ID NO: 4.

La figura 5 muestra los incrementos del peso corporal para ratones tratados con vehículo (rombos); ActRIIB(R64 20-134)-mFc (cuadrados) o la forma de semivida larga, ActRIIB(R64 A24N 20-134) (triángulos).

50 La figura 6 muestra los pesos de músculos disecados al final del estudio. Vehículo: Columna izquierda (sombreado claro) de cada grupo; ActRIIB(R64 20-134)-mFc: Columna central (sombreado medio) de cada grupo; ActRIIB(R64 20-134)-mFc: Columna derecha (sombreado oscuro) de cada grupo.

55 La figura 7 muestra las determinaciones de la fuerza de prensión para ratones SOD tratados con PBS y ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc (o "K74A+cola 15") murino (barras blancas y negras, respectivamente). La figura ilustra la fuerza aumentada del grupo con ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc en comparación con el grupo con PBS durante los estadios tanto precoces (día 117) como tardíos (día 149) de la enfermedad. \* P< 0,05, prueba de la t de Student bilateral.

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

65 La figura 9 muestra el porcentaje de cambio de la composición corporal en ratones alimentados con DAG, con PBS y ActRIIB(R64 20-134)-mFc (barras blancas y negras, respectivamente). El tratamiento con proteína

ActRIIB(R64 20-134)-Fc murina reduce significativamente la masa grasa y aumenta el tejido magro.

La figura 10 muestra secciones transversales de músculo bíceps crural (aumento 4x) de ratones ancianos (A) o ratones ancianos tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc (B).

La figura 11 muestra los pesos corporales medios para ratones en un experimento de caquexia por cáncer usando células CT26 de cáncer de colon. Rombos: animales sin tumor, tratados con solución salina; cuadrados: ratones sin tumor tratados con ActRIIB(R64 20-134)-mFc; triángulos: animales 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 tumoral para una modalidad preventiva.

La figura 12 muestra un alineamiento de ActRIIA humano y ActRIIB con los restos que se deducen en el presente documento, basándose en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para poner en contacto directo con el ligando (el bolsillo de unión a ligando) indicado con recuadros.

La figura 13 muestra un alineamiento de secuencias múltiple de diversas proteínas ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humano.

## Descripción detallada

### 1. Visión general

La presente invención se relaciona en términos generales con polipéptidos ActRIIB. Tal como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina de tipo IIB (ActRIIB) y proteínas relacionadas con ActRIIB, procedentes de cualquier especie. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente todas proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad serina/treonina-cinasa predicha. Las secuencias de aminoácidos de la proteína precursora de ActRIIA (proporcionada para comparación) y la proteína precursora de ActRIIB humanos se ilustra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) y en la figura 2 (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

La expresión "polipéptido ActRIIB" se usa para referirse a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos procedentes de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tiene una secuencia al menos un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB y preferentemente con una identidad de al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor.

En realizaciones específicas, la invención se relaciona con ciertos polipéptidos ActRIIB solubles para su uso en ciertas afecciones médicas. Tal como se describe en el presente documento, la expresión "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. La expresión "polipéptido ActRIIB soluble", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y generalmente es soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles incluyen los polipéptidos ActRIIB solubles que se ilustran en la figura 1 (SEQ ID NO: 1). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, véase el Ejemplo 1. La secuencia señal puede ser una secuencia señal nativa de un ActRIIB, o una secuencia señal de otra proteína, tal como una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno (TPA, por sus siglas en inglés) o una secuencia señal de melitina de abeja melífera (HBM).

Las señales de TGF- $\beta$  están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina-cinasa de tipo I y tipo II, los cuales fosforilan y activan proteínas Smad en fases posteriores tras la estimulación por el ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son todas proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores de tipo II se necesitan para unir ligandos y para la expresión de los receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión al ligando, que resulta en la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

Dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, se han identificado como los receptores de 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 algunas otras proteínas de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo 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 han encontrado que las proteínas de fusión ActRIIA-Fc y las proteínas de fusión ActRIIB-Fc solubles tienen efectos *in vivo* sustancialmente diferentes, teniendo ActRIIA-Fc efectos principales sobre hueso y teniendo ActRIIB-Fc efectos principales sobre músculo esquelético.

5 Los polipéptidos ActRIIB pueden usarse para antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también denominados como un ligando ActRIIB) con un polipéptido ActRIIB objeto (p. ej., un polipéptido ActRIIB soluble). Por tanto, dichos polipéptidos son útiles para tratar trastornos asociados con la actividad anómala de uno o más ligandos de receptores ActRIIB. Los ligandos de ejemplo de receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia TGF- $\beta$ , tales como activina, Nodal, GDF8, GDF11, y BMP7.

10 Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos dimericos y pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Existen tres activinas (A, B y AB) que son heterodímeros de dos subunidades  $\beta$  estrechamente relacionadas ( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$ , y  $\beta_A\beta_B$ ). En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores multifuncionales y exclusivos que pueden estimular producción hormonal en células ováricas y placentarias, apoyan la supervivencia de las células neuronales, influyen en el progreso del ciclo celular de forma positiva o negativa dependiendo del tipo de célula e inducen diferenciación mesodérmica el 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, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (EDF, por sus siglas en inglés) aislado de los monocitos leucémicos estimulados era idéntico a activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que activina A actúa como un regulador natural de la eritropoyesis en la médula ósea. En algunos tejidos, la señalización de activina se antagoniza por su heterodímero relacionado, inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (HEF) desde la hipófisis, la activina promueve la secreción y síntesis de HEF, mientras que la inhibina evita la secreción y síntesis de HEF. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de activina y/o unirse a activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP, por sus siglas en inglés),  $\alpha_2$ -macroglobulina, Cerberus y endogлина, que se describen a continuación.

15 Las proteínas nodales tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y el endodermo, así como de la organización posterior de estructuras axiales tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis precoz. Se ha demostrado que el tejido dorsal de un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye de forma predominante a las estructuras axiales de la notocorda y la placa precordial, mientras que recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar a través de receptores tanto de tipo I como de tipo II y de efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma et al., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Se ha sugerido que los ligandos Nodal interactúan con sus cofactores (p. ej., cripto) para activar los receptores de activina de tipo I y tipo II, que fosforilan a Smad2. Las proteínas nodales están implicadas en numerosos eventos críticos para el embrión vertebrado precoz, incluyendo formación del mesodermo, formación del patrón anterior y especificación axial izquierda-derecha. Los datos experimentales han demostrado que la señalización Nodal activa pAR3-Lux, un indicador de luciferasa que se ha demostrado previamente que responde de forma específica a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir a pTlx2-Lux, un indicador de respuesta específica a las proteínas morfogenéticas óseas. Estudios recientes proporcionan datos bioquímicos directos de que la señalización Nodal está mediada por las dos Smad de la vía activina-TGF-beta, Smad2 y Smad3. Datos adicionales han mostrado que se necesita la criptoproteína extracelular para la señalización Nodal, lo cual la hace distinta de la señalización de activina o TGF-beta.

20 El factor de diferenciación y crecimiento 8 (GDF8, por sus siglas en inglés) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. GDF8 está muy expresado en el músculo esquelético en desarrollo y del adulto. La mutación anuladora de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una hipertrofia e hiperplasia marcadas del músculo esquelético (McPherron et al., Nature, 1997, 387:83-90). Aumentos similares en la masa muscular esquelética son evidentes en mutaciones de origen natural de GDF8 en el ganado vacuno ((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. EE.UU., 1997, 94:12457-12461; y Kambadur et al., Genome Res., 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en seres humanos (Schuelke et al., N Engl J Med 2004;350:2682-8). Los estudios también han mostrado que la atrofia muscular progresiva asociada con la infección por VIH en seres humanos está acompañada de aumentos en la expresión de proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS, 1998, 95:14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (p. ej., creatina-cinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos (documento WO 00/43781). El polipéptido GDF8 puede unirse de forma no covalente al dímero del dominio 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 relacionadas estructuralmente con GDF8 y que inhiben su actividad biológica incluyen folistatina y potencialmente, proteínas relacionadas con folistatina (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

25 El factor de diferenciación y crecimiento 11 (GDF11), (también conocido como BMP11), es una proteína segregada (McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en el esbozo caudal, esbozo de las extremidades, arcos maxilares y mandibulares y ganglios de la raíz posterior durante el desarrollo del ratón (Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 juega un papel exclusivo en la formación de patrones en

- los tejidos tanto mesodérmico como neural (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208:222-32). Se ha demostrado que GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en la extremidad del polluelo en desarrollo (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229:407-20). La expresión de GDF11 en músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de una forma similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. De forma interesante, se ha encontrado que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu et al., 2003, Neuron. 37:197-207). Por tanto, GDF11 puede tener aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y neurodegenerativas (p. ej., esclerosis lateral amiotrófica).
- Es bien conocido que la proteína morfogenética ósea (BMP7, por sus siglas en inglés), también llamada proteína osteogénica 1 (OP-1) induce formación de hueso y cartilago. 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 ha encontrado que BMP7 juega un papel en la regulación del calcio y en la homeostasis ósea. Al igual que activina, BMP7 se une a los receptores de tipo II, ActRIIA y IIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan receptores de tipo I distintos en los complejos de receptor heteroméricos. El principal receptor de tipo I de BMP7 observado fue ALK2, mientras que activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina provocaron respuestas biológicas distintas y activaron diferentes vías de Smad (Macias-Silva et al., 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).
- Ciertos polipéptidos ActRIIB (p. ej., polipéptidos ActRIIB solubles) pueden usarse para antagonizar la señalización de ligandos ActRIIB, generalmente en cualquier proceso asociado con actividad de ActRIIB. Opcionalmente, los polipéptidos ActRIIB pueden antagonizar uno o más ligandos de receptores ActRIIB, tales como activina, Nodal, GDF8, GDF11, y BMP7, y pueden ser, por lo tanto, útiles en el tratamiento de trastornos adicionales.
- Por lo tanto, pueden usarse polipéptidos ActRIIB para tratar o prevenir enfermedades o afecciones que están asociadas con actividad anómala de un ActRIIB o un ligando ActRIIB. ActRIIB o los ligandos están implicados en la regulación de numerosos procesos biológicos críticos. Debido a sus funciones clave en estos procesos, pueden ser dianas deseables para la intervención terapéutica. Por ejemplo, Pueden usarse polipéptidos ActRIIB (p. ej., polipéptidos ActRIIB solubles) para tratar trastornos o afecciones humanas o animales. Los ejemplos de dichos trastornos o afecciones incluyen, pero no se limitan a, trastornos metabólicos tales como diabetes de tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (p. ej., síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por traumatismo (p. ej., quemaduras o desequilibrio del nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (p. ej., obesidad); trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluyendo la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia orgánica; debilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de atrofia muscular progresiva; Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en la tercera edad y/o en mujeres posmenopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; artrosis; y fracturas relacionadas con osteoporosis. Otros ejemplos adicionales incluyen masa ósea baja debida a glucocorticoterapia crónica, insuficiencia gonadal precoz, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Estos trastornos y afecciones se discuten más adelante en "Usos terapéuticos de ejemplo"
- Los términos que se usan en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación o en cualquier otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al facultativo para describir las composiciones y métodos de la invención y cómo hacerlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.
- "Alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado de error aceptable para la cantidad determinada dada la naturaleza o precisión de las determinaciones. Típicamente, los grados de error de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado.
- Como alternativa, y particularmente en los sistemas biológicos, las expresiones "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y más preferentemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas que se dan en el presente documento son aproximadas, a menos que se manifieste otra cosa, significando que puede inferirse la expresión "alrededor de" o "aproximadamente" cuando no se manifieste expresamente.
- Los métodos que se desvelan en el presente documento pueden incluir etapas de comparar secuencias entre sí, incluyendo la secuencia natural con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineamientos de secuencias poliméricas, p. ej., usando programas y/o algoritmos de alineamiento que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que, en dichos alineamientos, cuando una mutación contiene una inserción o eliminación de un resto, el alineamiento de secuencia introducirá un "hueco" (presentado típicamente por un guion, o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el resto insertado o eliminado.

"Homólogo" en todas sus formas gramaticales y variantes ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Dichas proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, tal como refleja su similitud de secuencia, bien en cuanto a porcentaje de identidad o bien mediante la presencia de restos o motivos específicos o posiciones conservadas.

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

Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando está modificado por un adverbio tal como "altamente" puede referirse a similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen evolutivo común.

## 2. Polipéptidos ActRIIB

En el presente documento se desvelan polipéptidos variantes ActRIIB (p. ej., polipéptidos ActRIIB solubles). Opcionalmente, los fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas tienen similares o las mismas actividades biológicas que sus polipéptidos ActRIIB naturales correspondientes. Por ejemplo, un ActRIIB variante puede unirse a e inhibir la función de un ligando ActRIIB (p. ej., activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB modula el crecimiento de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo y grasa. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2), y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (p. ej. las SEQ ID NO: 1, 5, 6 y 12).

La divulgación identifica porciones y variantes de ActRIIB funcionalmente activas. Los solicitantes han verificado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia desvelada por Hilden et al. (Blood. 15 abril 1994;83(8):2163-70), la cual tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la SEQ ID NO: 2 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por activina y GDF11. Por el contrario, la misma proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por activina y GDF11 en el intervalo nanomolar inferior a picomolar superior. Por lo tanto, una secuencia con una R64 se usa como la secuencia de referencia natural para ActRIIB en esta divulgación.

Attisano et al. (Cell. 10 de enero 1992;68(1):97-108) demostraron que una eliminación en el nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor por activina. Los datos que se presentan aquí muestran que la proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 2, "ActRIIB(20-119)-Fc" tiene unión reducida 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 conserva una actividad similar pero algo reducida en relación con la natural, aun cuando la región del nudo de prolina esté alterada. Por tanto, se espera que todos los dominios extracelulares ActRIIB que terminan en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 sean activos, pero las construcciones que terminan en 134 o 133 pueden ser las más activas. De forma similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los restos 129-134 alteren la afinidad de unión a ligando en grandes márgenes. En apoyo de esto, las mutaciones de P129 y P130 no reducen sustancialmente la unión a ligando. Por lo tanto, una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar ya en el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan unión a ligando reducida. El aminoácido 119 está mal conservado y por eso se altera o se trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o después conservan la actividad de unión a ligando. Las formas que terminan entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Puede ser deseable usar cualquiera de estas formas, dependiendo de la situación clínica o experimental.

En el extremo N de ActRIIB, se espera que una proteína que empieza en el aminoácido 29 o antes conservará la actividad de unión a ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glucosilación ligada a N sin afectar sustancialmente a la unión a ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señal y la región reticulada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29 se toleran bien. En particular, las construcciones que empiezan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 conservarán actividad y también se espera que las construcciones que empiezan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 conserven actividad. Los datos que se muestran en los ejemplos demuestran que, sorprendentemente, una construcción que empieza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

Tomadas en conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, y las construcciones pueden, por ejemplo, empezar en el resto correspondiente a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen construcciones que empiezan en una posición de 20-29 o 21-29 y terminan en una posición de 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133. Otros ejemplos incluyen construcciones que empiezan en una posición de 20-24 (o 21-24, o 22-25) y terminan en una posición de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133). También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, particularmente aquellas que tienen al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95% o un 99% de identidad con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 2.

La divulgación incluye los resultados de un análisis de estructuras compuestas, que se muestra en la figura 13, demostrando que el bolsillo de unión a ligando está definido por los restos 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. En estas posiciones, se espera que las mutaciones conservativas se toleren, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es una K in *Xenopus*, indicando que los aminoácidos básicos en esta posición se tolerarán. Q53 es R ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus* y, por tanto, los aminoácidos incluyendo R, K, Q, N y H se tolerarán en esta posición. Por tanto, una fórmula general para una proteína variante ActRIIB activa es una que comprenda los aminoácidos 29-109, pero empiece opcionalmente en una posición que oscila de 20-24 o 22-25 y termina en una posición que oscila de 129-134 y comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios de aminoácidos conservativos en el bolsillo de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión a ligando. Dicha proteína puede conservar más de un 80 %, 90 %, 95 % o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEC ID N°: 2. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los cuales la variabilidad puede tolerarse particularmente bien, incluyen los extremos amino y carboxilo del dominio extracelular (tal como se ha señalado anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) realmente mejora en la unión a ligando en el entorno de A64 y, por tanto, se espera que no tenga ningún efecto perjudicial sobre la unión a ligando en el entorno de R64. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el entorno de A64, demostrando, por tanto, que es probable que en esta región se tolere un cambio significativo. Mientras que un cambio R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por tanto, otro resto básico, tal como H puede tolerarse en la posición 64.

ActRIIB está bien conservada a lo largo de casi todos los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular conservados completamente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están altamente conservados. Por consiguiente, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan perspectivas sobre los restos que pueden alterarse. Por lo tanto, un variante ActRIIB humano activo puede incluir uno o más aminoácidos en posiciones correspondientes de la secuencia de ActRIIB de otro vertebrado, o puede incluir un resto que es similar al de la secuencia humana o de otro vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran esta estrategia para definir un variante ActRIIB activo. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus*, y por eso puede alterarse esta posición y opcionalmente puede alterarse a otro resto hidrófobo, tal como V, I o F, o a un resto apolar tal como A. E52 es una K in *Xenopus*, indicando que este sitio puede ser tolerante a una amplia variedad de cambios, incluyendo restos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K in *Xenopus*, indicando que en esta posición se tolera una amplia variación estructural, favoreciéndose restos polares, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es una K in *Xenopus*, y, por lo tanto, debería tolerarse Y o cualquier otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L. E111 es K in *Xenopus*, indicando que en esta posición se tolerarán restos cargados, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K in *Xenopus*, indicando que en esta posición se toleran restos básicos, incluyendo R y H. A en la posición 119 está relativamente mal conservada y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, por tanto, en esta posición debería tolerarse esencialmente cualquier aminoácido.

La divulgación demuestra que la adición de un sitio de glucosilación ligada a nitrógeno adicional (N-X-S/T) aumenta la semivida en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB(R64)-Fc. Introduciendo una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una semivida más larga. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque la última puede no glucosilarse de forma eficaz con la R en la posición 64. Pueden introducirse generalmente secuencias N-X-S/T en posiciones fuera del bolsillo de unión a ligando definido en la figura 12. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. También pueden introducirse secuencias N-X-S/T en el enlazador entre la secuencia ActRIIB y el Fc u otro componente de la fusión. Dicho sitio puede introducirse con un esfuerzo mínimo introduciendo una N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistentes, o introduciendo una S o T en una posición correspondiente a una N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glucosilación ligado a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinada con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se predice que se glucosilará puede alterarse a una T sin crear un sitio inmunogénico, a causa de la protección alcanzada por la glucosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que se glucosilará puede alterarse a una S. Por tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Del mismo modo, en una variante A24N, puede usarse una alteración S26T. Por consiguiente, un variante ActRIIB puede incluir una o más secuencias consenso de glucosilación ligada a N no endógenas.

La posición L79 puede alterarse para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce la unión a GDF-11 en mayor grado que la unión a activina. L79E o L79D conserva la unión a GDF-11. De manera destacable, las variantes L79E y L79D de acuerdo con la invención tienen unión a activina enormemente reducida. Los experimentos *in vivo* indican que estos receptores no de activina conservan una capacidad significativa de aumentar la masa muscular pero muestran efectos reducidos sobre otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad para obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre activina.

Las variaciones que se describen pueden combinarse de diversas formas. Además, los resultados del programa de mutagénesis que se describen en el presente documento indican que existen posiciones de aminoácidos en ActRIIB que suele ser beneficioso conservar. Éstas 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 tanto, en cada una de las variantes que se desvelan en el presente documento, la divulgación proporciona un armazón de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

Pueden obtenerse fragmentos aislados de los polipéptidos ActRIIB mediante exploración de los polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (p. ej., las SEQ ID NO: 3 y 4). Además, pueden sintetizarse químicamente fragmentos usando técnicas conocidas en la técnica tales como la química t-Boc o f-Moc en fase sólida de Merrifield. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o mediante síntesis química) y ensayarse para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando ActRIIB.

Una variante funcional de los polipéptidos ActRIIB puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 4 y 10. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 3, 4 y 10.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla hacer variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRIIB para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (p. ej., semivida *ex vivo* y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). También pueden producirse polipéptidos ActRIIB modificados, por ejemplo, mediante sustitución, eliminación, 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 relacionado estructuralmente (p. ej., mutaciones conservativas) no tendrá un efecto principal sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Puede determinarse fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB resulta en un homólogo funcional evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIB variante para producir una respuesta en células de una forma similar al polipéptido ActRIIB natural, o de unirse a uno o más ligandos, tales como activina, GDF-11 o miostatina de una forma similar al natural.

En realizaciones específicas, la presente invención contempla hacer mutaciones en el dominio extracelular (también denominado como dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB de modo que el polipéptido ActRIIB variante (o mutante) tiene actividades de unión a ligando alteradas (p. ej., afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, dichos polipéptidos ActRIIB variantes tienen afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos ActRIIB variantes tienen especificidad de unión alterado por sus ligandos.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos ActRIIB variantes que se unen de forma preferente a GDF8/GDF11 en relación con las activinas. La divulgación establece además la conveniencia de dichos polipéptidos para reducir efectos fuera de diana, aunque dichas variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves en las que pueden necesitarse ganancias de masa muscular muy grandes para el efecto terapéutico y en las que es aceptable un cierto nivel de efectos fuera de diana. Por ejemplo, restos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80, y F101, están en el bolsillo de unión a ligando y median unión a sus ligandos tales como activina y GDF8. Por tanto, un dominio de unión a ligando alterado (p. ej., dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIB, puede comprender una o más mutaciones en esos restos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada por un ligando tal como GDF8 en relación con un dominio de unión a ligando natural de un receptor ActRIIB. A modo de ilustración, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado por GDF8 sobre activina. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una proporción de  $K_d$  para la unión de activina con respecto a la  $K_d$  para la unión a GDF8 que es de al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con la proporción para la unión al dominio de unión a ligando natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una proporción de  $CI_{50}$  para inhibir activina con respecto a la  $CI_{50}$  para inhibir GDF8 que es de al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a ligando natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8 con una  $CI_{50}$  al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la  $CI_{50}$  para inhibir activina.

Como ejemplo específico, el resto de aminoácido Asp cargado positivamente del dominio de unión a ligando de ActRIIB puede mutarse a un resto de aminoácido diferente de modo que el polipéptido ActRIIB variante se une de forma preferente a GDF8, pero no a activina. Preferentemente, el resto D80 se cambia a un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un resto del aminoácido no cargado, un resto del aminoácido negativo, un resto del aminoácido hidrófobo, De acuerdo con la invención, el resto hidrófobo, L79, puede alterarse a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir enormemente la unión a activina mientras que se conserva la unión a GDF11. Tal como reconocerá un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes

o modificaciones descritas pueden hacerse a nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccional o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIB para alterar la glucosilación del polipéptido. En la figura 2 se ilustran sitios de glucosilación de ejemplo en polipéptidos ActRIIB. Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como sitios de glucosilación ligados a O o ligados a N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación ligados a asparagina comprenden generalmente una secuencia de tripéptido, asparagina-X-treonina (en la que "X" es cualquier aminoácido) que reconocen de forma específica enzimas de glucosilación celulares apropiadas. La alteración también puede producirse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia de polipéptido ActRIIB natural (para los sitios de glucosilación ligados a O). Una variedad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o en ambas, primera y tercera posiciones de aminoácido de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o la eliminación de aminoácido en la segunda posición) resulta en no glucosilación en la secuencia de tripéptido modificada. Otro medio de aumentar el número de restos de carbohidrato en un polipéptido es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el/los azúcar(es) pueden unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre, 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. págs. 259-306.

La eliminación de uno o más restos de carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIB puede lograrse químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacta la secuencia de aminoácidos. Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131 describen adicionalmente la desglucosilación química. La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos ActRIIB puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas tal como describen Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIB puede ajustarse, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto o vegetal pueden, todas ellas, introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden resultar afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para su uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glucosilación apropiada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamífero sean útiles también.

Esta divulgación contempla además un método para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido ActRIIB, incluyendo, opcionalmente, variantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El fin de la exploración de dichas bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptido ActRIIB que tengan propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada, o unión a ligando alterada. A continuación se proporciona una variedad de ensayos de exploración y dichos ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, puede explorarse la capacidad de unión a un polipéptido ActRIIB de una variante de polipéptido ActRIIB, para evitar la unión de un ligando ActRIIB a un polipéptido ActRIIB.

La actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes también puede ensayarse en un ensayo *in vivo* o basado en células. Por ejemplo, puede valorarse el efecto de una variante de polipéptido ActRIIB sobre la expresión de genes implicados en la producción ósea en un osteoblasto o precursor. Esto puede realizarse, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas de ligando ActRIIB recombinantes (p. ej., BMP7), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido ActRIIB y/o variantes del mismo y opcionalmente, un ligando ActRIIB. Del mismo modo, un polipéptido ActRIIB puede administrarse a un ratón u otro animal y pueden valorarse una o más propiedades óseas tales como la densidad o el volumen. También puede evaluarse el índice de consolidación para las fracturas óseas. De forma similar, también puede ensayarse cualquier efecto de la actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes en el crecimiento esas células, en células musculares, adipocitos y células neuronales. Por ejemplo, mediante los ensayos que se describen a continuación. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Puede usarse un gen indicador con respuesta a SMAD en dichas líneas celulares para verificar los efectos sobre la señalización en fases posteriores.

Pueden generarse variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva en relación con un polipéptido ActRIIB de origen natural. Dichas proteínas variantes, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes del polipéptido ActRIIB natural correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse, bien más estable o bien menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que resultan en la destrucción de, o la inactivación de otro modo de un polipéptido ActRIIB nativo. Dichas variantes y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido ActRIIB modulando la semivida de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una semivida corta puede

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

5 En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB útiles de la invención pueden comprender adicionalmente modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipiación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ACTRIIB modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Pueden ensayarse efectos de dichos elementos no aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ACTRIIB tal como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptido ActRIIB. Cuando un polipéptido ActRIIB se produce en las células mediante escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento postraducciona también puede ser importante para el plegamiento y/o función correctos de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la modificación y procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIB.

Las variantes funcionales o las formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB pueden incluir proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés), o seroalbúmina humana. Puede seleccionarse un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el fin de purificación por afinidad, se usan matrices pertinentes para cromatografía de afinidad, tales como resinas de glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ system (Qiagen), útil con moléculas asociadas de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIB. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diferentes proteínas fluorescentes (p. ej., GFP) así como "marcadores de epítopo", que suelen ser secuencias de péptido cortas para las cuales hay un anticuerpo específico disponible. Los marcadores de epítopo bien conocidos para los cuales hay anticuerpos monoclonales específicos fácilmente disponibles incluyen marcadores FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para factor Xa o trombina, que permite a la proteasa pertinente digerir las proteínas de fusión y liberar así las proteínas recombinantes de ellos. Las proteínas pueden aislarse después a partir del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizador" se quiere decir cualquier cosa que aumente la semivida en suero, independientemente de si esto es por destrucción reducida, aclaramiento reducido por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables en una amplia gama de proteínas. Del mismo modo, las fusiones con seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (p. ej., dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento muscular).

45 Como ejemplo específico, en el presente documento se desvela una proteína de fusión como un antagonista de GDF8 que comprende un dominio extracelular (p. ej., de unión a GDF8) fusionado a un dominio Fc (p. ej., la SEQ ID NO: 13).

**THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDGVE**  
**VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAKGQPR**  
**EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYS**  
**KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK\***

50 Preferentemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en restos tales como Asp-265, lisina 322, y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p. ej., la mutación Asp-265) tiene capacidad reducida de unión al receptor Fcγ en relación con un dominio Fc natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p. ej., la mutación Asp-434) tiene capacidad aumentada de unión al receptor Fc relacionado con el MHC de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc natural.

55 Se entiende que elementos diferentes de las proteínas de fusión pueden disponerse de cualquier manera que sea consecuente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede situarse en posición C-terminal a un dominio heterólogo o, como alternativa, un dominio heterólogo puede situarse en posición C-terminal a un polipéptido ActRIIB. El del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una

proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en posición C- o N-terminal a cada dominio o entre los dominios.

5 En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB útiles en la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ACTRIIB. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos ACTRIIB, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRIIB), y modificaciones del resto de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, eliminación de restos de carbohidrato de un polipéptido ActRIIB). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (p. ej., un dominio Fc). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (p. ej., Fc), como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de carbohidrato, o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

En el presente documento se desvelan formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de ActRIIB, que están aisladas de, o sustancialmente libres de otra forma de, otras proteínas.

20 Los polipéptidos ACTRIIB útiles de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos ActRIIB pueden sintetizarse usando técnicas de química de proteínas convencionales tales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Además, hay sintetizadores de péptidos automatizados disponibles comercialmente (p. ej., Advanced ChemTech Model 396; MilligenBioscience 9600). Como alternativa, los polipéptidos ACTRIIB, fragmentos o variantes de los mismos pueden producirse de forma recombinante usando diversos sistemas de expresión (p. ej., *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus) tal como es bien conocido en la técnica (véase también a continuación). En una realización adicional, los polipéptidos ActRIIB pueden producirse mediante digestión de polipéptidos ActRIIB de origen natural o de longitud completa producidos de forma recombinante usando, por ejemplo, una proteasa, p. ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina, o enzima convertidora de aminoácidos básicos apareados (PACE, por sus siglas en inglés). Puede usarse análisis informático (usando un programa informático disponible comercialmente, p. ej., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar sitios de escisión proteolítica. Como alternativa, dichos polipéptidos ActRIIB pueden producirse a partir de polipéptidos ActRIIB de origen natural o de longitud completa producidos de forma recombinante tales como técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mediante escisión química (p. ej., bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

### 3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB

40 En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIB (p. ej., polipéptidos ActRIIB solubles), incluyendo cualquiera de las variantes que se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor ACTRIIB de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 3 codifica un polipéptido ActRIIB soluble. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para hacer polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (p. ej., en una estrategia de terapia génica).

50 Se entiende además que los ácidos nucleicos objeto que codifican polipéptidos ACTRIIB incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como las variantes alélicas; y, por tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante designada en la SEQ ID NO: 4.

55 En el presente documento se desvelan secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID N°: 3. Alguien con experiencia habitual en la técnica apreciará que también se desvelan las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID N°:3 y las variantes de la SEQ ID N°: 3. Las secuencias de ácido nucleico pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

60 Otros ácidos nucleicos también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones de alta rigurosidad con la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 3, la secuencia complementaria de la SEQ ID N°: 3, o fragmentos de las mismas. Tal como se ha discutido anteriormente, alguien con experiencia habitual en la técnica entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN pueden variarse. Alguien con experiencia habitual en la técnica entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN pueden variarse. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación en cloruro sódico/citrato sódico (SSC, por sus siglas en inglés) 6,0 x a alrededor de 45 °C seguida de un lavado de SSC

2,0 x a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2,0 x a 50 °C hasta una alta rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o puede mantenerse constante la temperatura o la concentración de sal mientras se cambia la otra variable. En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja rigurosidad de SSC 6 x a temperatura ambiente, seguido de un lavado a SSC 2 x a temperatura ambiente.

También se desvelan ácidos nucleicos que difieren de los ácidos nucleicos tal como se exponen en la SEQ ID NO: 3 debido a la degeneración del código genético. Por ejemplo, una serie de aminoácidos están designados por más de un triplete. Codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden resultar en mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que en las células de mamífero existan polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto. Un experto en la técnica apreciará que entre individuos de una especie dada pueden existir estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta alrededor del 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular debido a variación alélica natural. Se desvelan cualquiera y todas las dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos.

Los ácidos nucleicos recombinantes pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula anfitriona usada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células anfitrionas. Típicamente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líderes o señal, sitios de unión a ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Se contemplan promotores constitutivos o inducibles tal y como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser, bien promotores de origen natural, o bien promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula o en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células anfitrionas transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula anfitriona usada.

El ácido nucleico objeto puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y unirse operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para la expresión directa del polipéptido ActRIIB. Por consiguiente, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras de ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, pueden usarse en estos vectores cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se unen operativamente a ella para expresar 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, promotor tet, promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores de VRS, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor de T7 cuya expresión está dirigida por la ARN-polimerasa de T7, las regiones operadora y promotora principales de fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para 3-fosfoglicerato-cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, p. ej., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento  $\alpha$  de levaduras, el promotor del poliedro del sistema baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procarionas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar y/o el tipo de proteína deseada que se va a expresar. Además, también deberían considerarse el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibióticos.

Puede producirse un ácido nucleico recombinante ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procarionas, en células eucariotas (de levadura, ave, insecto o mamífero), o en 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 procarionas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procarionas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNAVamp, pcDNAI/neo, pRclCMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección

de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y selección de resistencia farmacológica en células tanto procariontas como eucariotas. Como alternativa, pueden usarse derivados de virus tales como papilomavirus bovino (PVB-1) o el virus de Epstein-Barr (derivados de pHEBo, pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Pueden encontrarse ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales) a continuación en la descripción de los sistemas de dispensación de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de los organismos anfitriones son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariontas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, 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 deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUWI) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene  $\beta$ -gal).

Un vector se diseñará preferentemente para la producción de los polipéptidos ActRIIB objeto en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), los vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y los vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Tal como será evidente, las construcciones génicas objeto pueden usarse para causar la expresión de los polipéptidos ActRIIB objeto en células propagadas en cultivo, p. ej., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

En el presente documento se desvela una célula anfitriona transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (p. ej., la SEQ ID NO: 4) para uno o más de los polipéptidos ActRIIB objeto. La célula anfitriona puede ser cualquier célula procarionta o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB útil de la invención puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (p. ej., usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura, o células de mamíferos. Los expertos en la técnica conocen otras células anfitrionas adecuadas.

Por consiguiente, se desvelan métodos para producir los polipéptidos ActRIIB objeto. Por ejemplo, una célula anfitriona transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede segregarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIB. Como alternativa, el polipéptido ActRIIB puede retenerse en el citoplasma o en una fracción de membrana y las células recogerse, lisarse y aislarse la proteína. Un cultivo celular incluye células anfitrionas, medios y otros subproductos. Los medios de cultivo adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActRIIB objeto pueden aislarse a partir de medio de cultivo celular, células anfitrionas, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmovilización de anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo N 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  $\text{Ni}^{2+}$ . La secuencia líder de purificación puede eliminarse posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIB purificado (p. ej., véase Hochuli, et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht et al., *PNAS EE.UU.* 88:8972).

Las técnicas para hacer genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptido se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para el ligamiento, digestión con enzima de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, puede llevarse a cabo amplificación por PCR de fragmentos de gen usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden aparearse posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

#### 4. Anticuerpos

También se desvelan en el presente documento anticuerpos. Un anticuerpo que es reactivo de forma específica con un polipéptido ActRIIB (p. ej., un polipéptido ActRIIB soluble) y que se une de forma competitiva con el polipéptido ActRIIB puede usarse como antagonista de actividades del polipéptido ActRIIB. Por ejemplo, usando inmunógenos procedentes de un polipéptido ActRIIB, pueden hacerse antisueros o anticuerpos monoclonales anti-proteína/antipéptido mediante protocolos convencionales (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*

ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Puede inmunizarse un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo con una forma inmunogénica del polipéptido ActRIIB, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en una proteína o péptido incluyen conjugación con vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Puede administrarse una porción inmunogénica de un polipéptido ACTRIIB en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede supervisarse mediante la detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Pueden usarse ELISA u otros inmunoensayos convencionales con el inmunógeno como antígeno para valorar los niveles de anticuerpos.

Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIB, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales a partir del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recogerse células productoras de anticuerpo (linfocitos) a partir de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos convencionales de fusión de células somáticas con células inmortalizadoras tales como células de mieloma para producir células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de linfocito B humano (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. págs. 77-96). Puede explorarse inmuoquímicamente la producción de anticuerpos reactivos de forma específica con un polipéptido ActRIIB en las células de hibridoma y pueden aislarse anticuerpos monoclonales a partir de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento pretende incluir fragmentos del mismo que también reaccionan de forma específica con un polipéptido ActRIIB objeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y explorarse la utilidad en los fragmentos de la misma manera que se ha descrito anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab)<sub>2</sub> tratando anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo puede incluir moléculas biespecíficas, monocatenarias, y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido ActRIIB conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. El anticuerpo puede comprender además un marcador unido a éste y capaz de detectarse (p. ej., el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor enzimático).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal y la presente divulgación hace métodos disponibles para generar anticuerpos novedosos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido ActRIIB puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido ActRIIB eficaz para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obtener células productoras de anticuerpo (p. ej., células del bazo) a partir del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpo con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpo y ensayar los hibridomas productores de anticuerpo para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica al polipéptido ACTRIIB. Una vez obtenido, puede propagarse un hibridoma en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células procedentes del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une de forma específica al polipéptido ActRIIB. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo celular.

El adjetivo "reactivo de forma específica con" tal como se usa en referencia a un anticuerpo pretende significar, tal como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (p. ej., un polipéptido ActRIIB) y otros antígenos que no son de interés, que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales tienen generalmente una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar de forma eficaz entre los antígenos deseados y polipéptidos que reaccionan de forma cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción antígeno:anticuerpo es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque puede alcanzarse la especificidad deseada con un intervalo de afinidades diferentes, los anticuerpos preferidos generalmente tendrán una afinidad (una constante de disociación) de alrededor de 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> o menos.

Además, las técnicas usadas para explorar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo va a usarse para unirse a un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión a la solución. Hay disponible una variedad de técnicas diferentes para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmón superficial (p. ej. el ensayo de unión de Biacore, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de *sándwich* (p. ej., el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias de Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a un polipéptido ActRIIB soluble. Dichos anticuerpos pueden generarse de la misma forma que se ha descrito anteriormente, usando un polipéptido ACTRIIB soluble o fragmento

del mismo como antígeno. Los anticuerpos de este tipo pueden usarse, p. ej., para detectar polipéptidos ACTRIIB en muestras biológicas y/o supervisar niveles de polipéptido ActRIIB soluble en un individuo. En ciertos casos, un anticuerpo que se une de forma específica a un polipéptido ActRIIB soluble puede usarse para modular actividad de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB, regulando así (promoviendo o inhibiendo) el crecimiento de tejidos, tales como hueso, cartílago, músculo, grasa y neuronas.

#### 5. Ensayos de exploración

Los polipéptidos ActRIIB objeto (p. ej., polipéptidos ActRIIB solubles) pueden usarse para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados a través de esta exploración pueden ensayarse en tejidos tales como hueso, cartílago, músculo, grasa y/o neuronas, para valorar su capacidad para modular crecimiento tisular *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos pueden ensayarse además en modelos animales para valorar su capacidad para modular crecimiento tisular *in vivo*.

Existen numerosas estrategias de exploración de agentes terapéuticos para modular crecimiento tisular dirigiéndose hacia polipéptidos ACTRIIB. En ciertas realizaciones, puede llevarse a cabo exploración de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban efectos mediados por ActRIIB sobre el crecimiento del hueso, cartílago, músculo, grasa y/o neuronas. El ensayo puede llevarse a cabo para explorar e identificar compuestos que inhiben o reducen de forma específica la unión de un polipéptido ACTRIIB a su molécula asociada de unión, tal como un ligando ActRIIB (p. ej., activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Como alternativa, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIB a su proteína de unión tal como un ligando ActRIIB. Los compuestos pueden identificarse mediante su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Serán suficientes una variedad de formatos de ensayo y, a la luz de la presente divulgación, alguien con experiencia habitual en la técnica comprenderá, no obstante, los que no se describen expresamente en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, los compuestos (agentes) de ensayo de la invención pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Como alternativa, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Pueden producirse compuestos (agentes) para ensayar su capacidad de actuar como moduladores de crecimiento tisular, por ejemplo, mediante bacterias, levadura, vegetales u otros organismos (p. ej., productos naturales), producirse químicamente (p. ej., moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producirse de forma recombinante. Los compuestos de ensayo que se contemplan en el presente documento incluyen moléculas orgánicas no peptídico, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de ensayo puede ser una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de alrededor de 2.000 daltons.

Los compuestos de ensayo pueden proporcionarse como entidades individuales discretas, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tales como las hechas mediante química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser, bien en forma aislada o bien como mezclas de compuestos, especialmente en etapas de exploración iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S-transferasa (GST), reticulantes fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En numerosos programas de exploración de fármacos que ensayan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento a fin de aumentar al máximo el número de compuestos seguidos en un periodo de tiempo dado. Los ensayos que se llevan a cabo en sistemas acelulares, tales como los que pueden proceder de proteínas purificadas o semipurificadas, suelen preferirse como exploraciones "primarias" ya que pueden generarse para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de ensayo pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, centrándose el ensayo, en cambio, principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular, que puede hacerse manifiesto en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión (p. ej., un ligando ActRIIB).

Meramente para ilustrar, en un ensayo de exploración de ejemplo de la presente invención, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que habitualmente es capaz de unirse a un ligando ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB se añade después una composición que contiene un ligando ActRIIB. La detección y cuantificación de complejos ActRIIB/ligando ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejo entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede valorarse generando curvas de dosis respuesta a partir de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, también puede realizarse un ensayo de control para proporcionar un valor de referencia para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, el ligando ActRIIB aislado y purificado se

añade a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB y la formación de complejo ActRIIB/ligando ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en el que se mezclan los reactantes puede variar y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden usarse extractos y lisados celulares para producir un sistema de ensayo acelular adecuado.

La formación de complejo entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como polipéptido ActRIIB o su proteína de unión radiomarcados (p. ej.,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ ), marcados con fluorescencia (p. ej., FITC), o marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo, o mediante detección cromatográfica.

Pueden usarse ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, bien de forma directa, o bien indirecta, el grado de interacción entre un polipéptido ACTRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de onda óptica (publicación PCT WO 96/26432 y patente de EE.UU. n.º 5.677.196), resonancia de plasmón superficial (RPS), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con numerosos métodos.

Además, 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 alteran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 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). Pueden usarse sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (p. ej., moléculas o péptidos pequeños) que disocian 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 EE.UU. n.º 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

Los compuestos objeto pueden identificarse mediante su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse a nivel de la proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo fotorreticulación unión a ligando radiomarcado, y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden explorarse en un ensayo basado en mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ACTRIIB. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o fluida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido ACTRIIB puede transfectarse con un sistema indicador (p. ej.,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, o proteína fluorescente verde) dentro de una célula y explorarse frente a la biblioteca, preferentemente mediante una exploración de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Pueden usarse otros ensayos basados en mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con la diana fijada a un pocillo, perla o chip o capturada mediante un anticuerpo inmovilizado, o resolverse mediante electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse habitualmente usando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmón superficial.

En el presente documento se desvelan métodos y reactivos para estimular el crecimiento muscular y aumentar la masa muscular, por ejemplo, antagonizando funciones de un polipéptido ACTRIIB y/o un ligando ACTRIIB. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado pueden ensayarse en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular crecimiento muscular. Pueden utilizarse diversos métodos conocidos en la técnica para este fin. Por ejemplo, se realizan métodos de modo que la transducción de señales a través de una proteína ActRIIB activada mediante la unión a un ligando ActRIIB (p. ej., GDF8) se ha reducido o inhibido. Se reconocerá que el crecimiento de tejido muscular en el organismo resultaría en una masa muscular aumentada en el organismo en comparación con la masa muscular de un organismo (o población de organismos) correspondiente en el cual no se había efectuado tampoco la transducción de señales a través de una proteína ActRIIB.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIB o los compuestos de ensayo sobre el crecimiento/proliferación de la célula muscular puede determinarse midiendo la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, que están asociados con proliferación de células miogénicas, y la expresión génica de MyoD, que está asociado con diferenciación muscular (p. ej., Amthor et al., Dev Biol. 2002, 251:241-57). Se sabe que GDF8 regula negativamente la expresión génica de Pax-3 y Myf-5 y evita la expresión génica de MyoD. Se espera que los polipéptidos ActRIIB o los compuestos de ensayo antagonicen esta actividad de GDF8. Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye medir la proliferación de mioblastos tales como mioblastos C(2)C(12) en presencia de los polipéptidos ACTRIIB o los compuestos de ensayo (p. ej., Thomas et al., J Biol Chem. 2000, 275:40235-43).

En el presente documento se desvelan ensayos *in vivo* para medir masa y fuerza muscular. Por ejemplo, Whittemore et al. (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71) desvelan un método para medir masa muscular esquelética y fuerza de prensión aumentada en ratones. Opcionalmente, este método puede usarse para determinar efectos terapéuticos de los compuestos de ensayo (p. ej., polipéptidos ActRIIB) en enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo aquellas enfermedades para las cuales la masa muscular es limitante.

Pueden proporcionarse métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) formación de hueso e incrementar la masa ósea. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado pueden ensayarse en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular crecimiento de hueso o cartílago. Pueden utilizarse diversos métodos conocidos en la técnica para este fin.

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

También se contemplan ensayos *in vivo* para medir crecimiento de hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001) desvela un modelo osteoporótico de rata en el cual se estudia reparación ósea durante el periodo temprano tras la fractura. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) también desvela un modelo osteoporótico de rata en el cual se estudia reparación ósea durante el periodo tardío tras la fractura. Estas referencias desvelan un modelo de rata para el estudio sobre la fractura del hueso osteoporótico. La presente divulgación hace uso de ensayos de consolidación de fractura que son conocidos en la técnica. Estos ensayos incluyen técnica de fractura, análisis histológicos y análisis biomecánicos, que se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.521.750, que desvela protocolos experimentales para causar, así como para medir, el grado de fracturas y el proceso de reparación.

En el presente documento se desvelan métodos y agentes para controlar la ganancia de peso y la obesidad. A nivel celular, la proliferación y diferenciación adipocítica es crítica en el desarrollo de la obesidad, lo cual conduce a la generación de células de grasa (adipocitos). Por lo tanto, cualquier compuesto identificado pueden ensayarse en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular adipogénesis midiendo proliferación o diferenciación adipocítica. Pueden utilizarse diversos métodos conocidos en la técnica para este fin. Por ejemplo, el efecto de un polipéptido ActRIIB (p. ej., un polipéptido ActRIIB soluble) o compuestos de ensayo sobre la adipogénesis puede determinarse midiendo diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros en ensayos basados en células, tales como, observando la acumulación de triacilglicerol en tinción de vesículas con rojo oleoso O y mediante la aparición de ciertos marcadores adipocíticos tales como (aP2/422) y PPAR $\gamma$ 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 ensayos basados en células incluyen analizar el papel de polipéptidos ActRIIB y compuestos de ensayo en la proliferación de adipocitos o células precursoras de adipocitos (p. ej., células 3T3-L1), tales como, supervisando 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 exploración que se describen en el presente documento son pertinentes no solo para los polipéptidos ActRIIB y variantes de los polipéptidos ActRIIB objeto, sino también para cualesquiera compuestos de ensayo incluyendo agonistas y antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Además, estos ensayos de exploración son útiles para los fines de verificación de dianas farmacológicas y control de calidad.

## 6. Usos terapéuticos

En la presente invención, la proteína ActRIIB variante es para su uso para promover formación de hueso, aumentar la mineralización ósea, el tratamiento de la osteoporosis y el tratamiento de las fracturas óseas, el tratamiento de defectos del cartílago o el tratamiento de la densidad ósea baja.

Pueden usarse polipéptidos ActRIIB para tratar o prevenir una enfermedad o afección que está asociada con actividad anómala de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB (p.ej., GDF8), Estas enfermedades, trastornos o afecciones se denominan en general en el presente documento como "afecciones asociadas con ActRIIB". En el presente documento se desvelan métodos de tratamiento o prevención en un individuo que lo necesite a través de la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ActRIIB tal como se ha descrito anteriormente. Estos métodos se dirigen particularmente al tratamiento terapéutico o profiláctico de animales y, más particularmente, seres humanos.

Tal como se usa en el presente documento, un producto terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra del control no tratada, o retrasa el comienzo o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra del control no tratada. El término "tratar" tal como se usa en el presente documento incluye profilaxis de la citada afección o mejoría o eliminación de la afección una vez que se ha establecido.

Los complejos ActRIIB/ligando ActRIIB juegan papeles esenciales en el crecimiento tisular así como en procesos del desarrollo precoz tales como la formación correcta de diversas estructuras o en una o más capacidades posteriores al desarrollo incluyendo desarrollo sexual, producción hormonal hipofisaria y creación de hueso y cartilago. Por tanto, las afecciones asociadas con ActRIIB incluyen crecimiento tisular anómalo y defectos del desarrollo. Además,

5 las afecciones asociadas con ActRIIB incluyen, pero no se limitan a, trastornos del crecimiento y diferenciación celulares tales como inflamación, alergia, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y tumores.

Las afecciones asociadas con ActRIIB de ejemplo incluyen trastornos neuromusculares (p. ej., distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y atrofia muscular progresiva asociada con EPOC),

10 síndrome de atrofia muscular progresiva, sarcopenia, caquexia, trastornos del tejido adiposo (p. ej., obesidad), diabetes de tipo 2 y enfermedad degenerativa ósea (p. ej., osteoporosis). Otras afecciones asociadas con ActRIIB de ejemplo incluyen trastornos musculares degenerativos y trastornos neuromusculares, reparación tisular (p. ej., cicatrización de heridas), enfermedades neurodegenerativas (p. ej., esclerosis lateral amiotrófica), trastornos inmunológicos (p. ej., trastornos relacionados con proliferación o función anómala de linfocitos), y obesidad o

15 trastornos relacionados con proliferación o función anómala de adipocitos.

Las composiciones (p. ej., polipéptidos ActRIIB solubles) que se desvelan en el presente documento pueden usarse como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. El término "distrofia muscular" se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizado por debilitamiento y deterioro graduales de los músculos

20 esqueléticos y a veces del corazón y los músculos respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por atrofia y debilitamiento progresivos del músculo que empiezan con cambios microscópicos en el músculo. A medida que los músculos degeneran a lo largo del tiempo, la fuerza muscular de la persona disminuye. Las distrofias musculares de ejemplo que pueden tratarse con una pauta que incluya los polipéptidos ActRIIB objeto incluyen: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), distrofia muscular de cinturas (DMC), distrofia muscular facioescapulohumeral (FEH o DMFEH)

25 (también conocida como de Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (DMM) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (DMOF), distrofia muscular distal (DD), distrofia muscular congénita (DMC).

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 (DMB) debe su nombre al médico alemán Peter Emil Becker, que describió por primera vez esta variante de la DMD en la década de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en los varones, afectando a uno de cada 3.500 niños. La DMD aparece cuando el gen de la distrofina, situado en el brazo corto del cromosoma X, está roto. Como los varones solo

30 portan una copia del cromosoma X, solo tienen una copia del gen de la distrofina. Sin la proteína distrofina, el músculo se daña fácilmente durante los ciclos de contracción y relajación. Aunque al principio de la enfermedad el músculo se compensa mediante regeneración, más tarde, las células progenitoras musculares no pueden mantener el rimo del daño en curso y el músculo sano se sustituye por tejido fibroadiposo no funcional.

La DMD resulta de diferentes mutaciones en el gen de la distrofina. Los pacientes con DMD tienen algo de distrofina pero es, o bien de cantidad insuficiente o bien de mala calidad. Tener algo de distrofina protege los músculos de los que tienen DMB de degenerar de forma tan grave o tan rápida como los de las personas que tienen DMD.

40

Por ejemplo, investigaciones recientes demuestran que bloquear o eliminar la función de GDF8 (un ligando ActRIIB) *in vivo* puede tratar de forma eficaz al menos ciertos síntomas en pacientes con DMD y DMB. Por tanto, los polipéptidos ActRIIB de ejemplo pueden actuar como inhibidores (antagonistas) de GDF8 y constituyen un medio alternativo de bloquear las funciones de GDF8 y/o ActRIIB *in vivo* en pacientes con DMD o DMB. Esta estrategia está confirmada y respaldada por los datos que se muestran en el presente documento, por medio de los cuales se

45 demostró que una proteína ActRIIB-Fc aumenta la masa muscular en un modelo de ratón de distrofia muscular.

De forma similar, los polipéptidos ActRIIB objeto proporcionan un medio eficaz de aumentar la masa muscular en otras afecciones patológicas que necesitan crecimiento muscular. Por ejemplo, ELA, también llamada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de las motoneuronas) es un trastorno crónico, incurable e imparable del SNC que ataca a las motoneuronas, componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos esqueléticos. En la ELA, las motoneuronas se deterioran y terminan muriendo y aunque el cerebro de una persona permanece normalmente

55 funcionando y alerta completamente, la orden para moverse jamás alcanza los músculos. La mayoría de las personas que tienen ELA tiene entre 40 y 70 años de edad. Las primeras motoneuronas que se debilitan son las que se dirigen a los brazos o piernas. Los que tienen ELA pueden tener problemas para caminar, y se les pueden caer cosas, caerse, hablar de forma ininteligible y reír o llorar de forma incontrolable. Finalmente, los músculos de las extremidades empiezan a atrofiarse debido al desuso. Esta debilidad muscular se volverá debilitante y la persona necesitará una silla de ruedas o se volverá incapaz de funcionar fuera de la cama. La mayoría de los pacientes con ELA mueren de insuficiencia respiratoria o de complicaciones de la ventilación asistida como la neumonía, a los 3-5 años del comienzo de la enfermedad. Esta estrategia está confirmada y respaldada por los datos que se muestran en el presente documento, por medio de los cuales se demostró que una proteína ActRIIB-Fc mejora la aparición,

60 masa muscular y esperanza de vida en un modelo de ratón de ELA.

65

La masa muscular aumentada inducida por polipéptido ActRIIB podría beneficiar también a los que padecen enfermedades de atrofia muscular progresiva. Gonzalez-Cadavid et al. (citado anteriormente) publicaron que la expresión de GDF8 se correlaciona de forma inversa con la masa libre de grasa en seres humanos y que la expresión aumentada del gen GDF8 está asociada con la pérdida de peso en hombres con síndrome de emaciación por SIDA. Inhibiendo la función de GDF8 en los pacientes de SIDA, al menos ciertos síntomas de SIDA pueden aliviarse, si no eliminarse completamente, mejorando significativamente, por tanto, la calidad de vida en los pacientes de SIDA.

Como la pérdida de función de GDF8 (un ligando de ActRIIB) también está asociada con pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes (Zimmers et al., citado anteriormente; McPherron and Lee, citado anteriormente), los polipéptidos ActRIIB objeto pueden usarse además como agente terapéutica para retrasar o prevenir el desarrollo de obesidad y diabetes de tipo II. Esta estrategia está confirmada y respaldada por los datos que se muestran en el presente documento, por medio de los cuales se demostró que una proteína ActRIIB-Fc mejora el estado metabólico en ratones obesos.

El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer está entre los aspectos del cáncer más debilitantes y potencialmente mortales. La pérdida progresiva de peso en el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer es un aspecto común de muchos tipos de cáncer y es responsable, no solo de una mala calidad de vida y mala respuesta a la quimioterapia, sino también de un periodo de supervivencia más corto del que se encuentra en pacientes con tumores comparables pero sin pérdida de peso. Asociada con anorexia, consunción de grasa y tejido muscular, sufrimiento psicológico y una menor calidad de vida, la caquexia surge a partir de una interacción compleja entre el cáncer y el anfitrión. Es una de las causas de muerte más comunes entre los pacientes de cáncer y está presente en el 80 % en el momento de la muerte. Es un ejemplo complejo de caos metabólico que afecta al metabolismo de proteínas, carbohidratos, y grasas. Los tumores producen anomalías tanto directas como indirectas, resultando en anorexia y pérdida de peso. Actualmente, no existe tratamiento para controlar o invertir el proceso. El síndrome de anorexia-caquexia afecta a la producción de citocinas, liberación de factores movilizadores de lípidos e inductores de proteólisis y alteraciones en el metabolismo intermedio. Aunque la anorexia es común, una ingesta de alimento reducida sola es incapaz de justificar los cambios en la composición corporal que se observan en los pacientes de cáncer y el aumento de la ingesta de nutrientes es incapaz de invertir el síndrome de emaciación. Debe sospecharse caquexia en pacientes con cáncer si se produce una pérdida de peso involuntaria de más del cinco por ciento del peso premórbido dentro de un periodo de seis meses.

Como se encontró que la sobreexpresión sistémica de GDF8 induce una profunda pérdida de músculo y grasa análoga a la que se observa en los síndromes de caquexia humanos (Zimmers et al., citado anteriormente), pueden usarse beneficiosamente los polipéptidos ACTRIIB objeto como composiciones farmacéuticas para prevenir, tratar, o aliviar los síntomas del síndrome de caquexia, en el que se desea crecimiento muscular.

La presente invención proporciona una proteína ActRIIB variante para su uso en métodos para inducir formación de hueso y/o cartílago, prevenir la pérdida ósea, aumentar la mineralización ósea o prevenir la desmineralización del hueso. Por ejemplo, la proteína ActRIIB variante puede usarse en el tratamiento de la osteoporosis y en la consolidación de fracturas óseas y defectos del cartílago en seres humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRIIB pueden ser útiles en pacientes que están diagnosticados de densidad ósea baja subclínica, como una medida protectora contra el desarrollo de osteoporosis.

En una realización específica, la presente invención encuentra utilidad clínica en la consolidación de fracturas óseas y en defectos del cartílago en seres humanos y otros animales. La invención también puede tener uso profiláctico en la reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación ósea *de novo* inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismos, o inducidos por resección quirúrgica y también es útil en cirugía plástica cosmética. Además, los métodos y composiciones que se discuten en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de la periodontitis y en otros procesos de reparación dental. En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB objeto pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. La invención también se relaciona con el tratamiento de la osteoporosis y la reparación de defectos del cartílago. Además, los polipéptidos ActRIIB pueden usarse en la prevención/inversión de la artrosis.

La invención puede relacionarse con la reparación de fracturas y otras afecciones relacionadas con defectos del hueso y/o el cartílago o periodontitis.

En el presente documento se desvelan métodos y composiciones terapéuticas para la cicatrización de heridas y la reparación tisular. Los tipos de heridas incluyen, pero no se limitan a, quemaduras, incisiones y úlceras. Véase, p. ej., el documento WO84/01106. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los polipéptidos ActRIIB que se desvelan en el presente documento en mezcla con un vehículo, portador o matriz farmacéuticamente aceptables.

Los métodos y composiciones que se desvelan en el presente documento pueden aplicarse a afecciones causantes de pérdida ósea tales 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 peso corporal bajo y llevar un estilo de vida sedentario son factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea, que conduce a riesgo de fractura). Sin embargo, la osteoporosis también puede resultar de uso a largo plazo de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante de fármacos u otra afección clínica se conoce como osteoporosis secundaria. En una afección conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad excesiva de cortisol producida por el organismo resulta en osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados con osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida de forma natural por las glándulas adrenales. Aunque se necesitan niveles adecuados de hormonas tiroideas (que produce la glándula tiroidea) para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormona tiroidea puede reducir la masa ósea a lo largo del tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden conducir a pérdida ósea cuando los toman en dosis altas personas con problemas renales, particularmente las sometidas a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbitúricos que se usan para prevenir crisis epilépticas; metotrexato (Rheumatrex, Immunex; Folex PFS), un fármaco para ciertas formas de artritis, cáncer, y trastornos inmunitarios; ciclosporina (Sandimmun, Neoral), un fármaco usado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para deprimir el sistema inmunitario en pacientes de trasplantes de órganos; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), usados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), usados para tratar el colesterol alto. La enfermedad gingival causa pérdida ósea porque las bacterias perjudiciales de nuestra boca fuerzan a nuestros organismos a defenderse contra ellas. Las bacterias producen toxinas y enzimas bajo la línea gingival, causando una infección crónica.

En el presente documento se desvelan métodos y agentes terapéuticos para tratar enfermedades o trastornos asociados con crecimiento óseo anómalo o no deseado. Por ejemplo, en los pacientes que tienen la enfermedad conocida como fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) crece un "segundo esqueleto" anómalo que evita cualquier movimiento. Además, el crecimiento óseo anómalo puede producirse tras cirugía de reemplazo de cadera y, por tanto, echar a perder el resultado quirúrgico. Este es un ejemplo más común de crecimiento óseo patológico y una situación en la que los métodos y composiciones objeto pueden ser terapéuticamente útiles. Los mismos métodos y composiciones pueden ser también útiles para tratar otras formas de crecimiento óseo anómalo (p. ej., crecimiento patológico de hueso tras un traumatismo, quemaduras o lesión de la médula espinal) y para tratar o prevenir las afecciones indeseables asociadas con el crecimiento óseo anómalo que se observa en relación con cáncer de próstata metastásico u osteosarcoma. Los ejemplos de estos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos ActRIIB que antagonizan la función de un ligando ActRIIB (p. ej., BMP7), compuestos que alteran la interacción entre un ActRIIB y su ligando (p. ej., BMP7) y anticuerpos que se unen de forma específica a un receptor ActRIIB de modo que un ligando ActRIIB (p. ej., BMP7) no puede unirse al receptor ActRIIB.

En el presente documento se desvelan composiciones y métodos para regular el contenido de grasa corporal en un animal y para tratar o prevenir afecciones relacionadas con éste y, particularmente, afecciones que dañan la salud relacionadas con éste. Regular (controlar) el peso corporal puede referirse a reducir o aumentar el peso corporal, reducir o aumentar la velocidad de ganancia de peso, o aumentar o reducir la velocidad de pérdida de peso y también incluye mantener activamente, o no cambiar significativamente el peso corporal (p. ej., contra influencias externas o internas que podrían aumentar o disminuir de otra forma el peso corporal). En el presente documento se desvela la regulación del peso corporal mediante la administración a un animal (p. ej., un ser humano) que lo necesite de un polipéptido ActRIIB.

En el presente documento se desvelan métodos y compuestos para reducir el peso corporal y/o reducir la ganancia de peso en un animal y, más particularmente, para tratar o mejorar la obesidad en pacientes en riesgo de o que padecen obesidad. También se desvelan en el presente documento métodos y compuestos para tratar a un animal que es incapaz de ganar o mantener el peso (p. ej., un animal con un síndrome de emaciación). Dichos métodos son eficaces para aumentar el peso y/o masa corporal, o para reducir la pérdida de peso y/o masa, o para mejorar afecciones asociadas con o causadas por masa y/o peso corporal indeseablemente bajos (p. ej., no saludables).

Otras afecciones, incluyendo colesterol alto, que pueden tratarse con proteínas ACTRIIB se describen en los Ejemplos.

## 7. Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB útiles en la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido ACTRIIB solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto pueden formularse para su administración en cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

En ciertas realizaciones, la composición puede administrarse por vía tópica, sistémica, o local como un implante para un dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención es, por supuesto, una forma libre de pirógeno, fisiológicamente aceptable. Además, la composición puede, deseablemente,

encapsularse o inyectarse en una forma viscosa para su dispensación a un sitio del tejido diana (p. ej., hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo, un sitio que tiene un daño tisular. La administración puede ser adecuada para cicatrización de heridas y reparación tisular. Los agentes terapéuticos útiles distintos de los polipéptidos ActRIIB que también pueden incluirse opcionalmente en la composición, tal como se ha descrito anteriormente, pueden administrarse, como alternativa o adicionalmente, de simultáneamente o de forma secuencial con los polipéptidos ActRIIB objeto de la invención.

En ciertas realizaciones, las composiciones útiles de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de dispensar uno o más compuestos terapéuticos (p. ej., polipéptidos ActRIIB) a un sitio del tejido diana, proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de reabsorberse en el organismo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ACTRIIB. Dichas matrices pueden estar formadas de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones clínicas implantadas.

La elección de los materiales de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de la interfaz. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Otras matrices están comprendidas de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos, u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar comprendidas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionadas anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos pueden alterarse en su composición, tal como en el fosfato-aluminato cálcico y pueden procesarse para alterar su tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula, y biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, los compuestos útiles de la invención pueden administrarse por vía oral p. ej., en forma de capsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base saborizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa o goma arábiga) y/o colutorios y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), uno o más compuestos terapéuticos útiles de la presente invención puede mezclarse con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o expansores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y/o goma arábiga; (3) agentes de retención de humedad tales como glicerol, (4) agentes disgregantes, tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina, (6) acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas rellenas de gelatina dura o blanda usando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes usados de manera común en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales 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, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino, y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Además de los principios activos, las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes etoxilados isoestearílicos, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

Ciertas composiciones que se desvelan en el presente documento pueden administrarse por vía tópica, bien en la piel o bien en las mucosas. Las formulaciones tópicas pueden incluir además una o más de la amplia variedad de

agentes que se sabe que son eficaces como potenciadores de la penetración en la piel o el estrato córneo. Ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, dimetilsulfóxido, y azona. Pueden incluirse además agentes adicionales para hacer la formulación cosméticamente aceptable. Ejemplos de estos son grasas, ceras, aceites, colorantes, fragancias, conservantes, estabilizantes, y agentes tensioactivos. También pueden incluirse agentes queratolíticos tales como los conocidos en la técnica. Son ejemplos el ácido salicílico y el azufre.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, e inhalantes. El principio activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualesquiera conservantes, tampones o propulsores que puedan ser necesarios. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto objeto útil de la invención (p. ej., un polipéptido ActRIIB), excipientes, tales como grasas animales o vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y las pulverizaciones pueden contener, además de un compuesto objeto, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles sin sustituir, tales como butano y propano.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRIIB en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de su uso, las cuales pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el médico a cargo determinará la pauta de dosificación considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la invención (p. ej., polipéptidos ActRIIB). Los diversos factores dependerán de la enfermedad que se va a tratar. En el caso de trastornos musculares, los factores pueden incluir, pero no se limitan a, cantidad de masa muscular que se desea formar, los músculos más afectados por la enfermedad, la afección del músculo deteriorado, la edad sexo y dieta del paciente, el momento de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosificación. El progreso puede supervisarse mediante la valoración periódica del crecimiento y/o reparación musculares, por ejemplo, mediante prueba de fuerza, valoración por IRM del tamaño muscular y análisis de biopsias musculares.

Pueden administrarse uno o más polipéptidos ActRIIB, juntos (simultáneamente) o en momentos diferentes (de forma secuencial o solapada). Además, los polipéptidos simultáneamente pueden administrarse con otro tipo de agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente inductor de cartílago, un agente inductor de hueso, un agente inductor de músculo, un reductor de grasa, o un agente inductor de neuronas. Los dos tipos de compuestos pueden administrarse simultáneamente o en momentos diferentes. Se espera que los polipéptidos en momentos diferentes puedan actuar conjuntamente con o quizá sinérgicamente con otro agente terapéutico.

En un ejemplo específico, se han descrito una variedad de factores osteogénicos, inductores de cartílago e inductores de hueso, particularmente bifosfonatos. Véase, p. ej., las solicitudes de patente europea n.º 148.155 y 169.016. Por ejemplo, otros factores que pueden combinarse con los polipéptidos ActRIIB objeto incluyen diversos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF).

También se proporciona terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos ActRIIB. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótido ActRIIB en células o tejidos que

tienen los trastornos tal como se ha enumerado anteriormente. La dispensación de las secuencias de polinucleótido ActRIIB puede lograrse usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la dispensación de secuencias de polinucleótido ActRIIB se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

5 Los diversos vectores virales que pueden utilizarse para terapia génica, tal como se explica en el presente documento incluyen adenovirus, herpesvirus, virus de la variolovacuna, o, preferentemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un gen exógeno individual incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM), virus del sarcoma murino de Harvey (VSMH) virus del tumor mamario murino (VTMM) y virus del sarcoma de Rous (VSR). Una serie de vectores retrovirales adicionales puede incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que pueden identificarse y generarse células transducidas. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido, o una proteína. La dirección hacia la diana preferida se consigue usando un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden insertarse secuencias de polinucleótido específicas en el genoma retroviral o unirse a una envuelta viral para permitir la dispensación específica de diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIB. El vector puede dirigirse a células/tejidos de hueso, cartílago, músculo o neuronas.

20 Como alternativa, pueden transfectarse directamente células de cultivo de tejidos con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección con fosfato cálcico convencional. 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.

25 Otro sistema de dispensación dirigido para polinucleótidos ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos incluyendo 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 que son útiles como vehículos de dispensación *in vitro* e *in vivo*. Pueden encapsularse dentro del interior acuoso ARN, ADN y viriones intactos y dispensarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, p. ej., Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77,1981). Los métodos para una transferencia génica eficaz usando un vehículo de liposomas se conocen en la técnica; véase, p. ej., Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

35 Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y distearilfosfatidilcolina. La dirección hacia la diana de los liposomas también es posible basándose en, por ejemplo, la especificidad de órgano, la especificidad celular y la especificidad de órgano y también es conocida en la técnica.

### Ejemplos

45 La invención que se está describiendo ahora de forma general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertas realizaciones de la presente invención y no se pretende que limiten la invención.

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

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

55 ActRIIb-hFc se muestra más adelante como purificada a partir de líneas celulares de CHO (SEQ ID NO: 5).

**GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC**  
**WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTQ**  
**GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV**  
**DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTIS**  
**KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPP**  
**VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSLSPGK**

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

- (i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMWYISYIYA (SEQ ID NO: 7).
- (ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 8).
- (iii) Nativa: MGAAAICLAFAVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 9).

La forma seleccionada emplea la líder de TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos no procesada:

**MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEG**  
**EQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF**  
**CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS**  
**RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHQ**  
**DWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVK**  
**GFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVM**  
**HEALHNHYTOKSLSLSPGK**

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 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 CCCCCAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CTTGAGGTCA**  
**CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG**  
**ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT**  
**ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA**  
**AGTGCAAGGT CTCCAACAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGCCA**  
**AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA**  
**AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG**  
**AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCC GTGCTGGACT**  
**CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG**

**GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA**  
**GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA**

La secuenciación N-terminal del material producido por la célula CHO reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 11). De manera notable, otras construcciones publicadas en la bibliografía empiezan con una secuencia -SGR...

La purificación pudo lograrse mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía en sefarosa Q, cromatografía en fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación pudo completarse con filtración viral e intercambio de tampón.

Las proteínas de fusión ActRIIb-Fc también se expresaron en células HEK293 y células COS. Aunque el material de todas las líneas celulares y condiciones de cultivo razonables proporcionó proteína con actividad de construcción muscular *in vivo*, se observó variabilidad de la potencia, relacionada quizá con la selección de la línea celular y/o las condiciones de cultivo.

Ejemplo 2: Generación de mutantes ActRIIb-Fc

Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre el ActRIIB extracelular y el dominio Fc. La proteína de fusión ActRIIB-Fc original tiene la secuencia (porción Fc subrayada) de SEQ ID NO: 12:

**SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG  
 CWLDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT  
GGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTI  
SKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT  
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

10 Se introdujeron diversas mutaciones, incluyendo truncamientos N y C terminales, en la proteína ActRIIB-Fc original. Basándose en los datos que se presentan en el ejemplo 1, se espera que estas construcciones, si se expresan con una líder de TPA, carecerán de la serina N-terminal. Las mutaciones se generaron en el dominio extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Después 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 el documento WO2006/012627) de modo que tras el ligamiento creó una quimera de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en *E. coli* DH5 alfa, se recogieron las colonias y se aislaron los ADN. Para las construcciones murinas (mFc), se sustituyó una IgG2a murina por la IgG1 humana. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

20 Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección transitoria. En resumen, las células HEK293T se ajustaron en un agitador orbital de 500 ml a  $6 \times 10^5$  células/ml en medio Freestyle (Invitrogen), en 250 ml de volumen, y se cultivaron durante toda la noche. Al día siguiente, estas células se trataron con complejo ADN:PEI (1:1) a 0,5 µg/ml de concentración final de ADN. Después de 4 h, se añadieron 250 ml de medio y las células se cultivaron durante 7 días. El medio acondicionado se recogió precipitando las células y se concentró.

25 Los mutantes se purificaron usando una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, columna de proteína A y se eluyeron con tampón glicina a pH bajo (3,0). Después de la neutralización, éstas se dializaron contra PBS.

También se produjeron mutantes en células CHO mediante metodología similar.

30 Los mutantes se analizaron en ensayos y/o bioensayos de unión descritos a continuación. En algunos casos, los ensayos se realizaron con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas.

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

35 Se usó un ensayo de gen indicador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB Fc sobre la señalización por GDF-11 y activina A. Línea celular: Rabdomiosarcoma humano (procedente de músculo). Vector indicador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100.). Véase la figura 5. El motivo CAGA12 está presente en los genes con respuesta a TGF-Beta (gen PAI-1), de modo que este vector es de uso general para factores de señalización a través de Smad2 y 3.

Día 1: División de las células A-204 en placa de 48 pocillos.

45 Día 2: Las células A-204 se transfectan con 10 µg pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12 (10 µg)+ pRLCMV (1 µg) y Fugene.

Día 3: Adición de factores (diluidos en medio + BSA al 0,1 %). Es necesario preincubar los inhibidores con factores durante 1 h antes de añadirlos a las células. 6 horas después, las células se aclaran con PBS y las células se lisan.

50 Esto se sigue de un ensayo de luciferasa. En ausencia de cualquier inhibidor, activina A mostró 10 veces la estimulación de la expresión del gen indicador y una DE50~ 2 ng/ml. GDF-11:estimulación de 16 veces, DE50:~1.5 ng/ml.

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

Ejemplo 4. Inhibición de GDF-11 de truncamientos N-terminales y C-terminales

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

Truncamientos C-terminales de ActRIIB-hFc:

	CI50 (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB-hFc (R64, 20-134)	145	22
ActRIIB-hFc (R64, 20-132)	87	32
ActRIIB-hFc (R64, 20-131)	120	44
ActRIIB-hFc (R64, 20-128)	130	158

10 Como puede observarse, los truncamientos de tres (que terminan en...PPT), seis (que terminan en...YEP) o más aminoácidos en el extremo C causan un descenso de tres 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 el documento WO2006/012627).

15 Se hicieron truncamientos amino terminales en el entorno de una proteína ActRIIB-hFc (R64 20-131). Las actividades se muestran a continuación (determinadas en medios acondicionados):

Truncamientos N-terminales de ActRIIB-hFc:

	CI50 (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) (GBA...)	71	100
ActRIIB-hFc (R64,23-131) (EAE...)	60	43
ActRIIB-hFc (R64, 24-131) (AET...)	69	105

20 Por consiguiente, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N condujeron a la producción de una proteína más activa que las versiones con el dominio extracelular completo. Los experimentos adicionales muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIB-hFc (R64, 25-131) tiene una actividad equivalente a la de la forma no truncada y eliminaciones adicionales en el extremo N continúan degradando la actividad de la proteína. Por lo tanto, las construcciones óptimas tendrán un extremo C que termina entre los aminoácidos 133-134 de la SEQ ID NO: 4 y un extremo N que empieza en los aminoácidos 22-24 de la SEQ ID NO: 4. Un extremo N correspondiente a los aminoácidos 21 o 25 dará una actividad que es similar a la de la construcción ActRIIB-hFc (R64,20-134).

30 Ejemplo 5. Variantes ActRIIB-Fc, actividad basada en células

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc se analizó en un ensayo basado en células, tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 1, a continuación. Algunas variantes se analizaron en diferentes construcciones de truncamiento C-terminal. Tal como se ha discutido anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos causaron reducción de la actividad. De manera destacable, las variantes L79D y L79E mostraron una pérdida sustancial de unión a activina mientras que conservan casi toda la inhibición natural de GDF-11.

Unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF-11 y activina A:

Variaciones de ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 4)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
64R	20-134	+++ (K <sub>i</sub> aprox. 10 <sup>-8</sup> M)	+++ (K <sub>i</sub> aprox. 10 <sup>-8</sup> M)
64A	20-134	+ (K <sub>i</sub> aprox. 10 <sup>-6</sup> M)	+ (K <sub>i</sub> aprox. 10 <sup>-6</sup> M)
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 deficiente (K <sub>i</sub> de aproximadamente 1x10 <sup>-6</sup> ) ++ Actividad moderada (K <sub>i</sub> de aproximadamente 1x10 <sup>-7</sup> ) +++ Actividad buena (natural) (K <sub>i</sub> de aproximadamente 1x10 <sup>-8</sup> ) ++++ Actividad mayor que la natural			

5 Se ha valorado la semivida sérica en ratas de algunas variantes. ActRIIB(R64 20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(R64 A24N 20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividades en el ensayo basado en células (anterior) y en ensayos *in vivo* (a continuación) que son equivalentes a la molécula natural. Sumado a la semivida más larga, esto significa que, a lo largo del tiempo, una variante A24N dará mayor efecto por unidad de proteína que la molécula natural.

10 De manera destacable, la introducción de aminoácidos ácidos (ácido aspártico o glutámico) en la posición 79 disminuyó selectivamente la unión a activina mientras que se conservó la unión a GDF11/GDF8. Tal como se discute a continuación, las proteínas ActRIIB-Fc naturales parecen tener efectos sobre tejidos distintos al músculo, algunos de los cuales pueden ser indeseables. Tal como se desvela en el presente documento, se espera que estos efectos estén relacionados con los diversos ligandos diferentes que se unen y son inhibidos por ActRIIB-Fc, incluyendo, quizá, activina. Los datos iniciales indican que, en ratones, las variantes L79E y L79D tienen efectos reducidos sobre tejidos distintos del músculo mientras que conservan sus efectos sobre el músculo. Aunque las variaciones de este tipo pueden verse como variantes de ActRIIB, cabe destacar que estas proteínas ya no funcionan realmente como receptores de activina y, por tanto, el nombre "ActRIIB" es apropiado solo como indicador de la procedencia de estos polipéptidos. Aunque los restos ácidos en la posición 79 disminuyen la unión a activina mientras que conservan la unión a GDF11, otras alteraciones en esta posición no tienen este efecto. Un cambio L79A aumenta la unión en relación con la unión a GDF11. Un cambio L79P disminuye la unión tanto a activina como a GDF11.

Ejemplo 6. Unión a GDF-11 y activina A

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

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

30 Variantes IIB de especificidad de unión a ligando

Proteína	GDF11		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	1,34 e-6	1,13 e-4	8,42 e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	1,21 e-6	6,35e-5	5,19 e-11
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	6,7 e-5	4,39 e-4	6,55 e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3,8 e-5	2,74 e-4	7,16 e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6,77 e-5	2,41 e-5	3,56 e-11
Proteína	GDF8		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	3,69 e-5	3,45 e-5	9,35 e-11

ES 2 587 934 T3

Proteína	GDF11		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)			
ActRI3B-hFc (R64, L79D 20-134)	3,85 e-5	8,3 e-4	2,15 e-9
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3,74 e-5	9 e-4	2,41 e-9
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	2,25 e-5	4,71 e-5	2,1 e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	9,74 e-4	2,09 e-4	2,15 e-9
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	1,08 e-5	1,8 e-4	1,67 e-9
ActRIIB-hFc (R64, K74A 20-134)	2,8 e-5	2,03 e-5	7,18 e-11
Proteína	Activina A		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	5,94 e6	1,59 e-4	2,68 e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	3,34 e6	3,46 e-4	1,04 e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)			Unión baja
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)			Unión baja
ActRIIB-hFc (R64K 20-134) 6,82e6		3,25 e-4	4,76 e-11
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	7,46 e6	6,28 e-4	8,41 e-11
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	5,02 e6	4,17 e-4	8,31 e-11

Estos datos confirman los datos de los ensayos basados en células, demostrando que la variante A24N conserva una actividad de unión a ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB-hFc (R64 20-134) y que las moléculas L79D o L79E conserva la unión a miostatina y GDF11 pero muestra una unión marcadamente disminuida (no cuantificable) a activina A.

5

Se han generado y analizado otras variantes, tal como se publica en el documento WO2006/012627, usando ligandos acoplados al dispositivo y haciendo fluir el receptor sobre los ligandos acoplado. A continuación se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes:

10

Unión de variantes ActRIIB-Fc solubles a GDF-11 y activina A (ensayo BiaCore):

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD= 1,8 e-7M (+)	KD= 2,6 e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8,6 e-8M (+++)
+ cola 15	KD ~2,6 e-8M (+++)	KD=1,9 e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD= 4,35 e-9M +++++	KD= 5,3 e-9M +++++
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

ActRIIB	ActA	GDF11
* Unión no observada -- Unión < 1/5 WT (natural; siglas en inglés) - Unión ~1/2 WT + WT ++ Aumento de la unión < 2x +++ Aumento de la unión ~5x ++++ Aumento de la unión ~10x +++++ Aumento de la unión ~ 40x		

Ejemplo 7: Efecto de las proteínas ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones naturales

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

Se dieron a ratones C57B110 dosis (10 mg/kg; vía intraperitoneal (i.p.)) dos veces/semana, bien de la proteína ActRIIB (R64 20-134) humana, o bien de ACTRIIB (K74A 20-134) humana. Los ratones se escanearon mediante RMN el día 0 y el día 28 para determinar el cambio porcentual de la masa tisular magra corporal completa. Los ratones tratados con ActRIIB (R64 20-134)-Fc humana mostraron un aumento significativo del 31,1 % del tejido magro al compararlos con el grupo de control con vehículo. Los ratones tratados con la proteína ActRIIB (K74A 20-134)-Fc humana mostraron un aumento significativo de la masa tisular magra en comparación con la cohorte de control, si bien en menor grado que el grupo tratado con ActRIIB (R64 20-134) humana. En un estudio similar, los ratones se trataron dos veces/semana con PBS, 1 mg/kg, 3 mg/kg, o 10 mg/kg de ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina, por vía intraperitoneal. Al final del estudio se diseccionaron y se pesaron los músculos bíceps crural, gemelos, pectorales y diafragma. Los resultados se muestran en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Pesos tisulares de ratones naturales tratados con vehículo y ACTRIIB (WT, 20-134)-Fc murina

Tratados con vehículo	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)	Diafragma
Media (gramos) ± Desviación típica	0,306 ± 0,020	0,187 ± 0,040	0,257 ± 0,020	0,076 ± 0,020
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)	Diafragma
Media (gramos) ± Desviación típica	0,387 ± 0,010	0,241 ± 0,014	0,360 ± 0,070	0,124 ± 0,040
Valor de p de la prueba de la t	0,0001	0,009	0,02	0,04

20 Tal como se muestra en la tabla 3, la proteína de fusión ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina aumenta significativamente la masa muscular en ratones naturales. En los ratones tratados con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina, los músculos gemelos aumentaron un 26,5 %, los músculos bíceps crurales aumentaron un 28,9 %, los músculos pectorales aumentaron un 40,0%. También observamos cambios en el músculo diafragma, que aumentó en un 63 % en comparación con los ratones de control tratados con vehículo. La disminución del músculo diafragma es una complicación común en una variedad de distrofias musculares. Por lo tanto, el aumento del peso del diafragma que se observa después del tratamiento con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina podría ser de importancia clínica.

30 Ejemplo 8: Efecto de proteínas ActRIIB-Fc de semivida larga sobre la masa muscular en ratones naturales

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

35 Se dieron a ratones C57B110 dosis (10 mg/kg; vía intraperitoneal (i.p.)) dos veces/semana, bien de la proteína ActRIIB-mFc (R64 20-134) humana, o bien de ActRIIB-mFc (R64, A24N 20-134) humana. Los ratones se escanearon mediante RMN en distintos puntos hasta el día 25 para determinar el cambio porcentual de la masa tisular magra corporal completo. Ambas moléculas causaron aumentos equivalentes del peso corporal y masas musculares totales, oscilando los efectos sobre los músculos gemelos, bíceps crural y pectoral de un 40-70 % de aumento. Véanse las figuras 5 y 6.

40 Estos datos demuestran que la forma de semivida aumentada de la molécula promueve crecimiento muscular en un estudio a corto plazo con una potencia equivalente a la molécula natural.

45 Ejemplo 9: Efecto de proteínas ActRIIB-Fc con unión a activina reducida sobre la masa muscular en ratones naturales

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

Se dieron a ratones C57B110 dosis (10 mg/kg; vía intraperitoneal (i.p.)) dos veces/semana, bien de la proteína ActRIIB-mFc (R64 20-134) humana, o bien de ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134) humana. Los ratones se escanearon mediante RMN en distintos puntos hasta el día 24 para determinar el cambio porcentual de la masa tisular magra corporal completo. Los datos se muestran en la tabla a continuación.

5

	Peso corporal, día 0 (g)	Peso corporal, día 24 (g)	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)
TBS mod. (p/v)	24,4 ± 1,51	26,8 ± 1,43	0,29 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,05
R64,20-134 (10 mg/kg)	25,0 ± 1,36	31,2* ± 1,53	0,40* ± 0,02	0,24* ± 0,02	0,37* ± 0,07
R64, L79D, 20-134 (10/kg)	25,3 ± 1,22	28,1 ± 1,64	0,32* ± 0,02	0,20* ± 0,02	0,27 ± 0,05
					*p < 0,05

Estos datos demuestran que la variante L79D (unión a activina A reducida) de ActRIIB es activa *in vivo* para promover crecimiento muscular, sin embargo, la cantidad de crecimiento muscular es menor que la de ActRIIB natural. Este efecto disminuido puede estar causado en parte por la ligera reducción de la unión a miostatina o por la pérdida de unión a un regulador negativo adicional, hasta ahora desconocido, del crecimiento muscular. La capacidad de estimular crecimiento muscular sin afectar a la señalización de activina A es altamente deseable porque activina es una molécula reguladora expresada ampliamente que se sabe que tiene efectos sobre el sistema reproductor, hueso, hígado y muchos otros tejidos. En ratones, ActRIIB-mFc (R64 20-134) causa efectos sustanciales sobre el sistema reproductor y, en algunos casos, causa un aumento del tamaño del bazo. La molécula ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134) tuvo efectos enormemente atenuados tanto sobre los tejidos reproductores como sobre el bazo, indicando que esta molécula será particularmente adecuada para promover crecimiento muscular en pacientes que son activos reproductivamente o tienen el deseo de reducir al mínimo los efectos sobre el sistema reproductor.

10

15

20

Ejemplo 10: Efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la masa muscular y la fuerza en ratones *Mdx*

Con el fin de determinar la capacidad de la proteína ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina de aumentar la masa muscular en una afección patológica, los solicitantes determinaron la capacidad de la proteína ActRIIB-Fc de aumentar la masa muscular en el modelo de ratón *mdx* de distrofia muscular.

25

Se trató a ratones *Mdx* adultos dos veces/semana con la proteína ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina (1, 3, o 10 mg/kg; por vía intraperitoneal) o un control de vehículo con PBS. La fuerza que ejerce un ratón al tirar de un transductor de fuerza se mide para determinar la fuerza de prensión del miembro anterior. Se usó la fuerza promedio de 5 ensayos de tracción para la comparación de la fuerza de prensión entre las cohortes. Al final del estudio se diseccionaron y se pesaron los músculos bíceps crural, gemelos, pectorales y diafragma. Las determinaciones de la fuerza de prensión mostraron también un aumento significativo. Los resultados de la masa muscular se resumen en la tabla, a continuación.

30

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

35

Tratados con vehículo	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)	Diafragma
Media (gramos) ± Desviación típica	0,413 ± 0,040	0,296 ± 0,019	0,437 ± 0,060	0,111 ± 0,030
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc(10 mg/kg)	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)	Diafragma
Media (gramos) ± Desviación típica	0,52 ± 0,050	0,39 ± 0,05	0,807 ± 0,21	0,149 ± 0,020
Valor de p de la prueba de la t	0,0006	0,0006	0,002	0,05

Tal como se ilustra en la tabla, los grupos tratados con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina presentaron masa aumentada de tejido magro en los ratones *mdx* en comparación con los ratones tratados con PBS. El tratamiento con ActRIIB-Fc aumentó el tamaño del gemelo un 25,9 %, el tamaño del bíceps crural un 31,8 % y los músculos pectorales en un 85,4 % en comparación con el grupo de control con vehículo. De posible importancia clínica, también encontramos que los pesos del diafragma de los ratones tratados con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc de ratón estaban aumentados un 34,2 % en comparación con el control. Estos datos demuestran la eficacia de la proteína ActRIIB-Fc en una afección patológica de distrofia muscular.

40

45

Además, los ratones *mdx* tratados con la proteína ActRIIB-Fc presentan fuerza de prensión aumentada en comparación con los controles tratados con vehículo. A las 16 semanas, los grupos con 1, 3 y 10 mg/kg de ActRIIB demostraron un 31,4%, 32,3% y 64,4% de aumento de la fuerza de prensión, respectivamente, en comparación con el grupo de control con vehículo. El rendimiento mejorado de la fuerza de prensión de los grupos tratados con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina respalda la idea de que el músculo aumentado encontrado en los grupos de tratamiento es fisiológicamente pertinente. Los ratones *Mdx* están predispuestos a la lesión inducida por contracción y sufren significativamente más ciclos de degeneración y regeneración que sus homólogos naturales. A pesar de estos fenotipos musculares, el tratamiento con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina aumenta la fuerza de prensión en los ratones *mdx*.

En la distrofia muscular de Duchenne, el comienzo de la enfermedad se produce al principio de la infancia, a menudo ya a los cinco años. Por consiguiente, los datos presentados anteriormente con respecto a los ratones adultos no reflejan necesariamente los efectos que tendría una molécula ActRIIB en niños con DMD. Para abordar esto, se llevó a cabo un estudio con ratones *mdx* jóvenes.

El tratamiento con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) aumenta significativamente el peso corporal en ratones C57BL/10 y *mdx* jóvenes (de cuatro semanas de edad). El análisis de la composición corporal usando espectroscopia de RMN *in vivo* reveló aumento de la masa tisular magra acompañado de pesos corporales mayores. Los ratones C57BL/10 tratados con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) ganaron un 35,2 % de masa tisular magra y el grupo de *mdx* tratado ganó un 48,3 % más de masa tisular magra que sus cohortes de control respectivas. Además, se valoró el efecto del tratamiento con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) sobre la fuerza. Las puntuaciones de fuerza de prensión en ratones *mdx* tratados con vehículo fueron un 15,7 % más bajas que en la cohorte de C57BL/10 con vehículo, ilustrando así la debilidad muscular asociada con la deficiencia en distrofina. Por el contrario, los ratones *mdx* tratados con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) mejoraron su fuerza de prensión en comparación con el grupo con vehículo de *mdx*, y consiguieron determinaciones de la fuerza de prensión que sobrepasaron a los ratones C57BL/10 con vehículo y alcanzaron el nivel de puntuaciones de fuerza de prensión de los C57BL/10 tratados (*mdx* con vehículo:  $0,140 \pm 0,01$  KgF; *mdx* tratados:  $0,199 \pm 0,02$  KgF; C57BL/10 con vehículo:  $0,166 \pm 0,03$ ;  $0,205 \pm 0,02$  KgF). De manera destacable, el tratamiento devolvió a los ratones *mdx* jóvenes a los niveles naturales de la fuerza de prensión. Por lo tanto, es probable que la molécula ActRIIB-mFc (R64, 20-134) tenga importantes aplicaciones clínicas en la distrofia muscular de Duchenne, particularmente en pacientes jóvenes a una edad cercana al comienzo de la enfermedad.

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

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

Los ratones B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, o SOD1 portan altos números de copias del alelo mutante del transgén de la superóxido-dismutasa humana. Los niveles altos de esta proteína transmiten un fenotipo a los ratones que es comparable al de la enfermedad de ELA humana. Los ratones SOD1 desarrollan parálisis ascendente y presentan signos precoces de la enfermedad hacia los 91 días. La enfermedad resulta en muerte prematura que se produce entre las 19-23 semanas de edad.

Se dieron a ratones SOD1 dosis de un control de vehículo o ActRIIB-mFc (K74A 20-134) (5 mg/kg, i.p. dos veces/semana) empezando a las 10 semanas de edad. La fuerza que ejerce un ratón al tirar de un transductor de fuerza es una medida de la fuerza de prensión del miembro anterior. Se usó la fuerza promedio de 5 ensayos de tracción para la comparación de la fuerza de prensión entre las cohortes. La supervivencia se calculó como el número de días entre la fecha en la que nació el ratón y la fecha en la que el ratón fue incapaz de incorporarse antes de 30 segundos de ser colocado sobre su costado. La figura 7 muestra las determinaciones de la fuerza de prensión y la figura 8 ilustra los datos de supervivencia.

Los ratones en el estadio terminal de la enfermedad se acicalan con dificultad, presumiblemente debido a la progresión de la parálisis y aparecen desaliñados. La observación somera de los ratones reveló que el grupo de tratamiento con ActRIIB (K74A 20-134)-Fc murina aparecía bien acicalado incluso en los estadios terminales de la enfermedad en comparación con el grupo con PBS. Esta observación sugiere que los ratones tratados tienen mejor salud y mantienen una mejor calidad de vida que los controles.

Tal como se observa en la figura 7, los ratones SOD1 que reciben el tratamiento con ActRIIB (K74A 20-134)-Fc presentan una fuerza de prensión significativamente mayor en comparación con la cohorte de control con PBS. Esto se observa en el día 117, el estadio precoz de la enfermedad, así como después de que la enfermedad ha avanzado hasta el día 149. La figura 8 ilustra que los ratones tratados con ActRIIB (K74A 20-134)-Fc sobrevivieron significativamente durante más tiempo que los controles con vehículo. Este estudio ilustra la utilidad de la ActRIIB (K74A 20-134)-Fc murina en el modelo de ratón de ELA para mejorar tanto la fuerza como la supervivencia de los ratones.

Se realizó un experimento similar con ratones SOD1, pero el tratamiento se retrasó hasta el inicio detectable a grandes rasgos del comienzo de la enfermedad (día 130), para mimetizar mejor el tratamiento de la ELA humana

después del comienzo de síntomas significativos de la enfermedad. En el día 130, se dividió a los ratones SOD1 en grupos tratados, bien con vehículo (TBS modificado) o bien con ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg). Se dieron a los ratones dosis por vía subcutánea una vez por semana. Los ratones se escanearon mediante RMN en los días de estudio 1 y 27 (edades de 129 y 157 días, respectivamente). Se realizaron determinaciones de la fuerza de prensión en los días del estudio 0 y 20. Al final del estudio, el grupo de control de machos había perdido un 4,3 % de su peso corporal del día del estudio 0, mientras que el grupo tratado ganó un 7,8 % de sus pesos del día del estudio 0. El grupo de control de hembras perdió un 1,5 % y la cohorte tratada de hembras ganó un 15 % de sus pesos corporales del día del estudio 0.

5

10 Determinación de la fuerza de prensión de SOD1

	Día 0	Día 20
Control de machos	0,149 ± 0,02	0,097 ± 0,02 <sup>a</sup>
Machos con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,147 ± 0,02	0,128 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
Control de hembras	0,130 ± 0,02	0,091 ± 0,02 <sup>a</sup>
Hembras con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,128 ± 0,01	0,11 ± 0,02 <sup>b</sup>

Determinaciones de la fuerza de prensión en los días 0 y 20 en ratones SOD1 machos y hembras. El superíndice "a" indica diferente significativamente en comparación con la determinación respectiva del día 0 (p< 0,05). El superíndice "b" indica diferencia significativa entre las determinaciones del día 20 en PBS (Grupo 1) y ActRIIB (R64 20-134)-mFc (Grupo 2).

15

Los ratones se escanearon mediante RMN para determinar cambios en la composición corporal atribuidos al tratamiento. Los ratones macho de control perdieron un 6,0 % de su masa tisular magra a lo largo del transcurso del estudio (día 1: 18,2 g ± 1,28; día 27: 17,1 g ± 1,10), Los ratones tratados macho ganaron un 9,1 % de su masa tisular magra del día 0 (día 1: 19,17 g ± 0,77; día 27: 20,92 g ± 0,74). Los ratones hembra de control tuvieron una reducción del 0,83 % de masa magra desde el principio del estudio (día 1: 13,18 g ± 0,84; día 27: 13,08 g ± 0,71) y los ratones hembra tratados tuvieron un aumento del 10,7 % en su peso corporal del día 0 del estudio (día 1: 13,66 g ± 0,83; día 27: 15,12g ± 1,21), Los grupos tratados tanto de machos como de hembras ganaron cantidades significativas de tejido magro en comparación con sus grupos de control con PBS respectivos (p< 0,001).

20

25

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

	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)
Control de machos	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,20 ± 0,04
Machos 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 con ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,17 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,15 ± 0,05

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

30

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

Los solicitantes analizaron las proteínas ActRIIB-mFc en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (DAG) para determinar la capacidad de ActRIIB-Fc de reducir la adiposidad en un modelo de ratón de obesidad.

35

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

40

Se mantuvieron ratones C57BL/6 con DAG con una dieta compuesta de un 35 % de grasa y se consideró que estaban obesos cuando su peso corporal fue aproximadamente un 50 mayor que el de los ratones emparejados por edad alimentados con dieta de pienso convencional (4,5 % de grasa). Se dieron a ratones obesos dosis dos veces/semana, bien de un control de vehículo, o bien de ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc humana (10 mg/kg; i.p.).

45

Los ratones obesos se escanearon mediante RMN para determinar su composición corporal al principio de la dosificación y después de 3 semanas de dosificación. Los en la composición corporal desde el inicio se resumen en la figura 9.

5 Los ratones se alimentaron con una DAG y se consideraron obesos cuando sus pesos corporales fueron un 50 % más pesados que los de sus homólogos alimentados con pienso convencional. Se dieron a ratones alimentados con DAG dosis, bien de un control de vehículo, o bien de ACTRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc murina (5 mg/kg dos veces/semana; i.p.) durante 35 semanas. Al final del estudio, se hizo ayunar a los ratones durante toda la noche. Al final del ayuno, se recogió sangre y se procesó para obtener suero. El suero se usó después para determinar niveles de insulina en ayunas para ambas cohortes. Los resultados del efecto de la se ActRIIB (K74A 20-134)-Fc murina sobre los niveles de insulina en ayunas se resumen en la tabla, a continuación.

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

	DAG con PBS	DAG con ActRIIB (K74A 20-134)-mFc murina
Promedio (ng/ml) ± DT	2,27 ± 1,64	0,78 ± 0,40
Prueba de la t	N/P	0,012

15 La figura 9 muestra la adiposidad disminuida de la cohorte con ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc murina al compararla con los controles tratados con vehículo. Se encontró que los ratones tratados tenían un descenso del 25,9 % de la masa grasa en comparación con sus niveles iniciales. Además, el grupo tratado aumento su masa magra en un 10,1 % por encima de sus niveles iniciales. El cambio porcentual de la masa tanto de tejido adiposo como de tejido magro de la ACTRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc fue significativamente mayor que los cambios porcentuales del grupo tratado con PBS.

25 En este modelo, los ratones se mantuvieron con una dieta alta en grasa hasta que fueron > 50 % más pesados que sus homólogos alimentados con pienso convencional. Basándose en este destacable aumento en el peso corporal y la adiposidad, parece lógico que este modelo podría corresponder con los seres humanos que se caracterizan como obesos mórbidos. Por lo tanto, el hallazgo de que el tratamiento con proteína ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc humana reduce la adiposidad en ratones obesos podría ser clínicamente pertinente para el tratamiento de los seres humanos obesos mórbidos.

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

35 Se llevaron a cabo experimentos adicionales con ActRIIB-mFc (R64 20-134) en el modelo de DAG para obesidad y diabetes. Se dividió a ratones C57BL/6 alimentados con DAG de 30 semanas de vida en 2 grupos (PBS y 10 mg/kg de ActRIIB-mFc (R6420-134)). Los ratones se pesaron y se les dieron dosis 2X/semana por vía intraperitoneal durante 12 semanas. Los ratones se valoraron mediante RMN en los días del estudio 0 y 94.

40 Los ratones tratados perdieron un 1,9 % de sus pesos corporales del día 0 del estudio mientras que los ratones tratados con PBS ganaron un 6,7 % de su PC de partida durante el estudio. Los ratones tratados también ganaron significativamente más tejido magro que el grupo con PBS (21,1 % ± 6,28 frente a 3,7 % ± 4,08) durante el estudio. Los ratones tratados también perdieron tejido graso significativo (-34% ± 10,95) en comparación con el grupo con PBS (+10,2 ± 10,18). Los pesos musculares individuales también aumentaron en el grupo tratado con ActRIIB-mFc (R64 20-134).

	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)
PBS	0,33 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,31 ± 0,05
ActRIIB-mFc (R64 20-134)	0,44 ± 0,08*	0,25 ± 0,02*	0,44 ± 0,13*
*p< 0,05			

Además de los efectos beneficiosos sobre la grasa y el músculo que se asocian con el 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 marcadamente, indicando que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc pueden usarse para reducir los niveles de estos lípidos en pacientes.

Ejemplo 13: Efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones caquéticos

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

Se dieron a los ratones dosis por vía subcutánea diariamente durante 13 días, bien PBS o bien dexametasona (2 mg/kg) para inducir atrofia muscular. A lo largo de los mismos 13 días, los grupos tratados con PBS o dexametasona recibieron vehículo o ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg; i.p.; dos veces/semana) de modo que estuvieran representadas todas las combinaciones de tratamientos. Los ratones se escanearon mediante RMN los días 0 y 13 para determinar cambios en la masa tisular magra a lo largo de los grupos. Los resultados de la RMN se señalan en la Tabla 6, a continuación.

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

Grupo (tratamiento sc:ip)	Prom. magro día 13-Prom. magro día 0 (g) ± DT
PBS:PBS	0,83 ± 0,94
Dexamet:PBS	0,47 ± 0,34 <sup>a</sup>
Dexamet:ActRIIB	2,56 ± 0,37 <sup>a,b</sup>
PBS:ActRIIB	3,63 ± 0,62 <sup>a</sup>
<sup>a</sup> Diferencia significativa en comparación con PBS:PBS a p < 0,05 <sup>b</sup> Diferencia significativa en comparación con Dexamet:PBS a p < 0,05	

El escaneado mediante RMN mostró un descenso del 2,5 % significativo de la masa tisular magra en el grupo con dexametasona:PBS en comparación con la cohorte con PBS:PBS. Por el contrario, el grupo con dexametasona:ActRIIB (R64 20-134)-mFc presentó un aumento del 13,5 % de la masa tisular magra, un aumento significativo al compararlo con los grupos tanto con PBS:PBS como con dexametasona:PBS. La caquexia es un efecto secundario indeseable para una variedad de tratamientos terapéuticos, incluyendo la glucocorticoterapia crónica. Por lo tanto, podría ser de importancia clínica que el tratamiento con una proteína ActRIIB (R64 20-134)-mFc humana pudiera atenuar la atrofia muscular asociada con la caquexia.

Ejemplo 14: Efecto de ActRIIB-Fc sobre la masa muscular y la obesidad en ratones ancianos u ovariectomizados.

La sarcopenia es una forma de pérdida muscular asociada con el envejecimiento en seres humanos por otra parte sanos. El trastorno está asociado con una pérdida progresiva de masa muscular esquelética y fuerza y movilidad alteradas. Las causas de la sarcopenia se comprenden mal. En las mujeres, la menopausia acelera la pérdida muscular, de la misma forma que lo hace con respecto a la pérdida ósea. Por consiguiente, se analizó ActRIIB (R64, 20-134)-mFc en ratones extremadamente viejos (de dos años de vida) y en ratonas ovariectomizadas (un modelo de estado menopáusico).

Se ovariectomizó (OVX), o bien se operó de forma simulada a ratonas hembra C57BL/6 de 8 semanas; después se las dejó llegar a las 16 semanas de edad antes del inicio del estudio. Al principio del estudio, las ratonas simuladas y OVX se dividieron en cada caso en grupos de tratamiento y de vehículo. Todos los grupos se pesaron y se les dieron dosis semanales, bien de ActRIIB (R64, 20-134)-mFc o de control de tampón durante 11 semanas. Todas las ratonas tuvieron escaneados mediante RMN los días del estudio 0 y 83 para determinar la composición corporal.

Al final del estudio, las ratonas simuladas con PBS habían perdido un 4,7 5 de su masa magra original mientras que el grupo tratado de forma simulada aumentó su masa magra en un 21 % a lo largo del transcurso del estudio. Las OVX de control perdieron un 12,1 % (significativamente más que las simuladas con vehículo) de su masa magra mientras que las ratonas OVX tratadas ganaron un 12,9 % hacia el final del estudio.

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

Para valorar los efectos de ActRIIB-Fc en una población senescente de forma natural, se dejó llegar a ratones C57BL/6 macho hasta 70 semanas de edad antes del inicio 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 les dieron dosis 2X/semana durante 10 semanas. A lo largo del transcurso del estudio, los grupos tratados ganaron significativamente más masa tisular magra que el grupo con PBS.

% cambio de masa magra	PBS	10 mg/kg
Promedio (% desde el inicio)	101,76	117,27
DT	3,83	3,91
Valor de p con respecto a PBS		< 0,001

El grupo tratado también tuvo pesos musculares significativamente mayores en comparación con los ratones con PBS.

5

Pesos musculares	Gemelos (I+D)	Bíceps crural (I+D)	Pectorales (I+D)
PBS	0,283 ± 0,07	0,15 ± 60,01	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 con PBS, ya que, aparentemente, se redujo la grasa intramuscular y se mejoró la citoarquitectura. (Véase la figura 10).

10 Estos datos demuestran que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc pueden usarse para tratar atrofia muscular asociada con edad avanzada en hombres y mujeres.

Ejemplo 15: Efecto de ActRIIB-Fc sobre la pérdida muscular asociada con la castración

15 El cáncer de próstata se trata comúnmente con terapia antiandrogénica. Los efectos secundarios del tratamiento incluyen pérdida muscular y obesidad aumentada. Los ratones castrados sufren cambios similares, haciendo de éste un buen modelo para el estudio del potencial de ActRIIB-Fc para su uso en esta situación clínica.

20 Se castró o se operó de forma simulada a ratones C57BL/6 macho de 8 semanas, después se les dejó recuperarse durante 3 semanas antes del comienzo del estudio. Los grupos simulados y castrados se subdividieron adicionalmente en grupos con PBS y ActRIIB (R64, 20-134)-mFc (10 mg/kg). Los ratones se pesaron y se les dieron dosis por vía subcutánea una vez/semana durante 12 semanas. Los ratones se escanearon mediante RMN en los días del estudio 0 y 83.

25 A lo largo del transcurso del estudio, los ratones simulados tratados con PBS ganaron un promedio de 9,72% ± 3,67 y los ratones simulados con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc ganaron un 35,79 % ± 3,1 de masa tisular magra del día 0 del estudio. Los ratones castrados tratados con PBS perdieron un 8,1 % ± 4,22 de su masa tisular magra del día 0, mientras que los ratones castrados tratados ganaron un 17,77 % ± 3,86. Además, la castración conduce a adiposidad aumentada, pero el tratamiento con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc ayudó a reducir el grado de ganancia de masa grasa.

30 Los músculos gemelos y pectorales de los ratones castrados con vehículo fueron más pequeños que los de los ratones simulados con PBS (gemelos de castrados: 0,275 ± 0,03g, pectorales de castrados: 0,196 ± 0,06g; gemelos de simulados: 0,313 ± 0,02g, pectorales de simulados: 0,254 ± 0,03 g). El tratamiento con ACTRIIB (R64, 20-134)-mFc atenúa significativamente este descenso de pesos musculares inducido por la castración (gemelos de castrados: 0,421 ± 0,03 g, pectorales de castrados: 0,296 ± 0,06 g).

Ejemplo 16: Efectos de ActRIIB-Fc sobre la caquexia por cáncer

40 Numerosos tumores están asociados con pérdida de apetito y pérdida muscular grave. Los pacientes que presentan caquexia tienen un pronóstico peor que los pacientes no caquéticos. La línea celular CT26 de cáncer de colon induce caquexia profunda en ratones. Se analizaron los efectos de ActRIIB(R64 20-134) sobre caquexia inducida por xenoinjerto en este modelo.

45 En este experimento se usaron seis grupos de ratones, del modo siguiente:

Grupo	Tumores	Tratamiento	Dosis	Sistema
1	N	VEH	v/v	Terapéutico
2	N	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapéutico

Grupo	Tumores	Tratamiento	Dosis	Sistema
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 3-6 recibieron  $5 \times 10^6$  células tumorales por vía subcutánea. El grupo 6 comenzó el tratamiento inmediatamente con ActRIIB-Fc dos veces por semana. Los grupos 1-5 comenzaron la dosificación el día 28 del estudio cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 300-500 mm<sup>3</sup>. Tal como se muestra en la figura 11, ActRIIB-Fc descendió marcadamente la pérdida muscular asociada con tumores por CT26, tanto en ratones con tumores establecidos como cuando se usó en un modelo preventivo antes de la introducción del tumor.

Ejemplo 17: Efecto de variantes ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones naturales

Este estudio demostró los efectos de las siguientes construcciones de Fc relacionadas con ActRIIB sobre la masa muscular y otros tejidos en ratones macho C57BL/6 de 6 semanas de edad. Los ratones se pesaron y recibieron una inyección por vía intraperitoneal, quincenalmente, bien de PBS, o bien de construcciones de 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

Los ratones se escanearon mediante RMN al comienzo, la mitad y al final del estudio. Los músculos bíceps crural, pectoral y gemelos y el hígado, riñones y bazo se pesaron y se guardaron en formalina.

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

Aunque se han discutido realizaciones específicas de la materia objeto, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones se harán evidentes para los expertos en la técnica al revisar esta memoria descriptiva y las reivindicaciones a continuación. El alcance completo de la invención debe determinarse mediante referencia a las reivindicaciones y a la memoria descriptiva.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> Variantes procedentes de ActRIIB y sus usos <130> P47899EP1/NJL.

<140>

<141> 04-02-2008

<150> 60/899.304

<151> 02-02-2007

<150> 60/927.088

<151> 01-05-2007

<150> 60/931.880

<151> 25-05-2007

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 3.3

5 <210> 1  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 1

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

15 <210> 2  
 <211> 512  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

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

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

<210> 3  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

tctgggctg gggagctga gacacgggag tgcattact acaacgcaa ctgggagctg 60  
 gagcgacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggaaa gggctgctc 120  
 tgctacgct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctg 180  
 ctgatgact tcaactgcta cgataggcag gagggtgtgg ccaactgagga gaacccccag 240  
 gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca tttgccagag 300  
 gctgggggccc cggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc 348

10

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

15

<400> 4

```

atgacggegc cctgggtggc cctcgeccctc ctctggggat cgctgtggcc cggetctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcata tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgtctac 180
gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggtg ctggctagat 240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccagggtgtac 300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatattgcc agaggctggg 360
ggcccggagg tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420
tactcaotgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttgatgtac 480
cggcatcgca agcccccta cggcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

```

```

ccatcccctc tggtagggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggggcgc 600
tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtcaa cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggetccctca cggattacct caaggggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatak 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agcctctat tgcccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
acgagacggg acatggctcc tgaggtgctc gaggagcca tcaactcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200
aaggctgcag acggacctgt ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg ttgaggagcg ggtgtocctg 1440
attcggaggt cggccaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggg gacctotgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

<210> 5  
 <211> 343  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 5

5

10

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



<220>

<223> Descripción de Organismo desconocido: Activador tisular del plasminógeno

5 <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**

<210> 9

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

<220>

15 <223> Descripción de Organismo desconocido: Péptido nativo

<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**

20 <210> 10

<211> 1107

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción sintética

30 <400> 10

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60  
 tcgcccggcg cctctgggcy tggggaggct gagacacggg agtgcatacta ctacaacgcc 120  
 aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggago gctgogaagg cgagcaggac 180  
 aagcggctgc actgctaagc ctctctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240  
 aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300  
 gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga ggccttcaact 360  
 catttgccag aggtggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc 420  
 ggtgggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480  
 gtcttctctc tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 540  
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720  
 aagtgcgaagg tctccaacaa agccctcca gtccccatcg agaaaacat ctccaagacc 780  
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 840  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga catcgccgtg 900  
 agtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960  
 tccgacggct ccttcttctc ctatagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag 1020  
 gggaaagctc tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta caccgagaag 1080  
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

<210> 11

35 <211>6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 587 934 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 11

5

Gly Arg Gly Glu Ala Glu  
1 5

<210> 12

<211> 344

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción sintética

15

<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

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											

- 5 <210> 13
- <211> 225
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
  
- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción sintética
  
- 15 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (43)
- <223> Asp o Ala
  
- 20 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (100)
- <223> Lys o Ala
  
- 25 <220>
- <221> MOD\_RES
- <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  
 Lys  
 225

- <210> 14
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

- <210> 15
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 587 934 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Marcador de His 6x sintético

<400> 15

5

**His His His His His His**  
**1 5**

<210> 16

<211> 368

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción sintética

15

<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					320				
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser				
				325				330						335					
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala				
			340				345						350						
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
		355					360					365							

<210> 17  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 17

5

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

<210> 18  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 18

10

15

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  
 115

<210> 19  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus sp.*

5

<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

10

<212> PRT  
 <213> *Sus sp.*

<400> 20

5

```

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

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.*

10

<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

5

<210> 22  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <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  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> *Bos sp.*

5

<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

10

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

5 <210> 24  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus sp.*

<400> 24

Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu 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

10 <210> 25  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 15 <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



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína ActRIIB variante para su uso para promover formación de hueso, promover formación de cartílago, aumentar la mineralización ósea, el tratamiento de la osteoporosis, el tratamiento de fracturas óseas, el tratamiento de defectos del cartílago, o el tratamiento la densidad ósea baja, en la que la proteína ActRIIB variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, en la que la proteína comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 2.
- 10 2. La proteína ActRIIB variante para su uso de la reivindicación 1, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % o 99 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. La proteína ActRIIB variante para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteína comprende una R o una K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 2.
- 20 4. La proteína ActRIIB variante para su uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína comprende una D o una E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 2.
- 25 5. La proteína ActRIIB variante para su uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que empieza en un resto de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 22-25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en un aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 131, 133 o 134 de la SEQ ID NO: 2.
- 30 6. La proteína ActRIIB variante para su uso de la reivindicación 5, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que empieza en el aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en el aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 2.
- 35 7. La proteína ActRIIB variante para su uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína es un homodímero.
- 40 8. La proteína ActRIIB variante para su uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga.
- 45 9. La proteína ActRIIB variante para su uso de la reivindicación 8, en la que la porción heteróloga comprende una región constante de cadena pesada de una IgG.
- 50 10. La proteína ActRIIB variante para su uso de la reivindicación 9, en la que la porción heteróloga comprende un dominio Fc.
- 55 11. La proteína ActRIIB variante para su uso de la reivindicación 10, en la que la proteína de fusión comprende además un dominio enlazador situado entre el polipéptido ACTRIIB y el dominio Fc.
12. La proteína ActRIIB variante para su uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína incluye uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados de entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y un aminoácido conjugado con un resto lipídico.
13. La proteína ActRIIB variante para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en la que la proteína comprende además una secuencia de purificación seleccionada de entre: un marcador de epítipo, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST.
14. La proteína ActRIIB variante para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en la que la proteína ActRIIB variante inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células.
15. Una preparación farmacéutica que comprende la proteína ActRIIB variante para su uso de cualquier reivindicación precedente.

Secuencia de polipéptido ActRIIB soluble humano (extracelular) designada como  
SEQ ID NO: 1 (116 aa)

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GC

WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT

Figura 1

Secuencia de precursor de ActRIIB humano designada como SEQ ID NO: 2 (NM\_001106, 512 aa)

MTAPWVALALLWGS~~W~~PGSGRGEAETRECIYYNANWELERTN~~Q~~SGLERCEGEQDKRL  
HC

YASWRN~~S~~SGTIELVKKGCWLD~~F~~NCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL  
PE

AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHED  
PG

PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMND~~F~~VAVKIFPLQDKQSWQSEREIF  
ST

PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITW~~N~~ELCHVAET  
MS

RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLAD~~F~~GLAVRFEPGKPP  
GD

THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYM  
LP

FEEBIGQHP~~S~~LEELQEVVHKKMRPTIKDHWLKH~~P~~GLAQLCVTI~~E~~ECWDHDAEARLS  
AG

CVEERVSLIRRSVNGTTS~~D~~CLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Figura 2

**Secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB soluble humano (extracelular), designada como SEQ ID NO: 3 (348 pb)**

```
tctgggCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACC  
aaccagagCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCCTGCTACGCCTCCTGGCGC  
aacagctctGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGG  
caggagtgtgtGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAAC  
gagCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCC  
acc
```

**Figura 3**

Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEQ ID NO: 4 (nucleótidos 5-1543 de NM\_001106, 1539 pb)

```
atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggctctgggcgtggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctg
gagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtggtgtggcc
actgaggagaacccccaggtgacttctgctgctgtggaaggcaacttctgcaacgagcgccttcaactcat
ttgccagaggctgggggcccgaagtacgtacgagccacccccgacagcccccaccctgctcacggctg
ctggcctactcaactgctgcccacgggggaccttccctcatcgtcctgctggccttttggatgtaccgg
catcgcaagccccctacggctcatgtggacatccatgaggaccctgggacctccaccacatccccctctg
gtggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggctgttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttcccactccaggacaagcagctcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcatgtctgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgttagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctgggtgcccgtggcgagggccacaagccgtctattgcccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcga
tttgagccagggaaacctccaggggacccccacggacaggtaggcagagacgggtacatggctcctgag
gtgctcgagggagccatcaacttccagagagatgccttccctgcgcattgacatgtatgccatgggggtg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggacccgtggatgagtacatgctgccctt
gaggaagagatggccagcacccttcgttggaggagctgcaggagggtgggtggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcaactggttgaaàcaccgggacctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgc
tgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgggctgtgtggaggagcgggtgtccctgatccggagg
tcggtcaacggcactacctcggactgtctcgtttccctgggtgacctctgtcaccaatgtggacctgcc
cctaaagagtcaagcatctaa
```

Figura 4

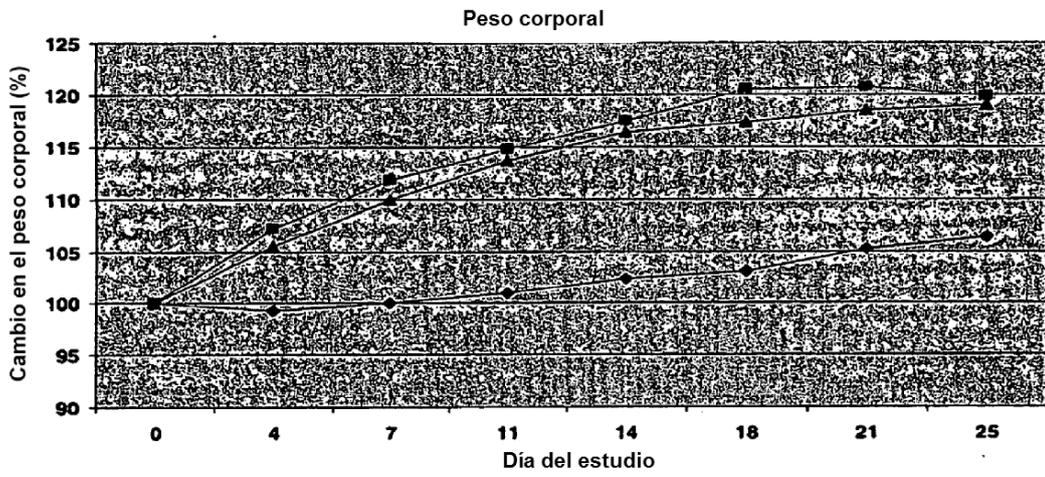


Figura 5

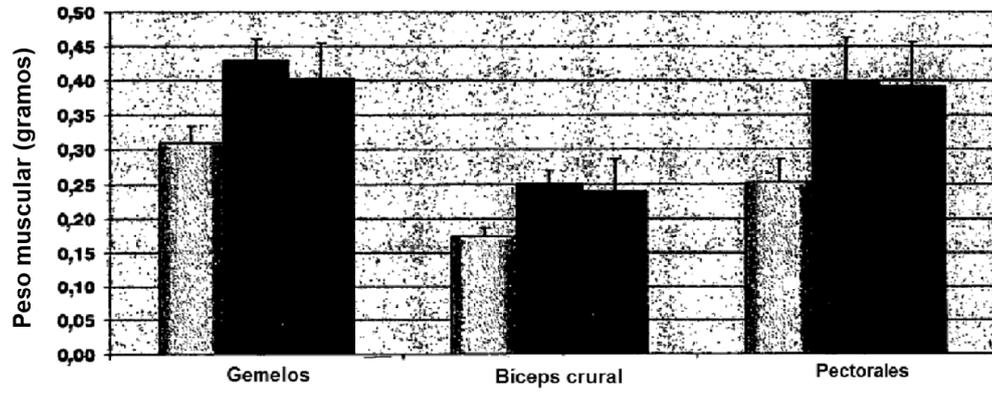


Figura 6

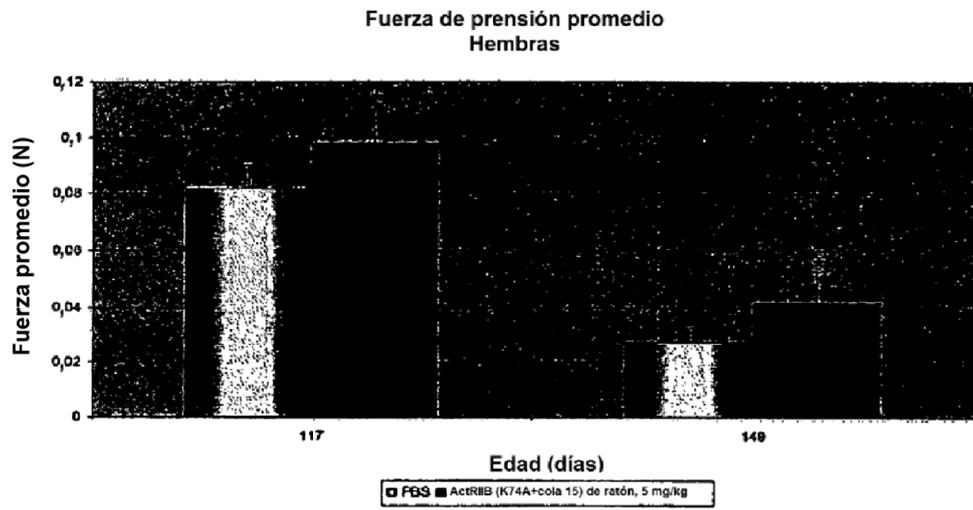
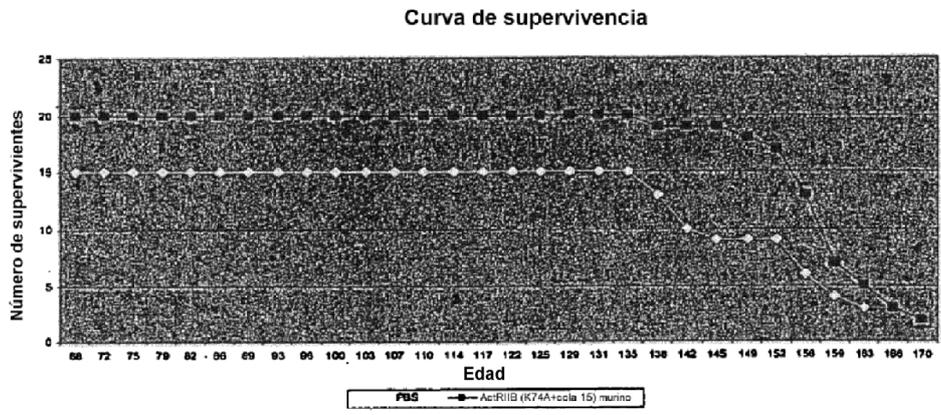


Figura 7



**Figura 8**

Porcentaje de composición corporal inicial  
Alimentados con DAG

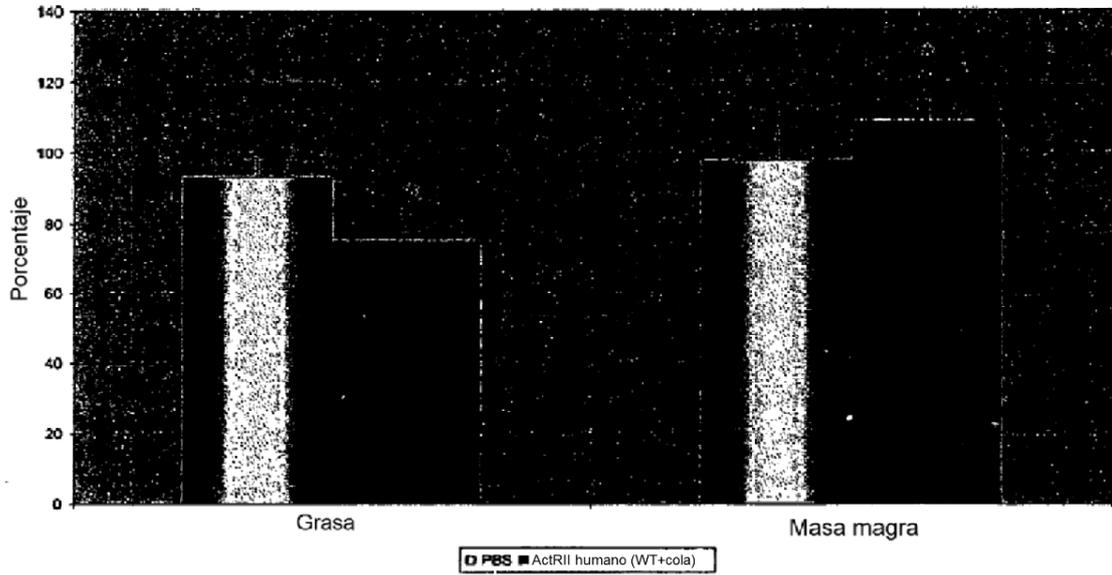
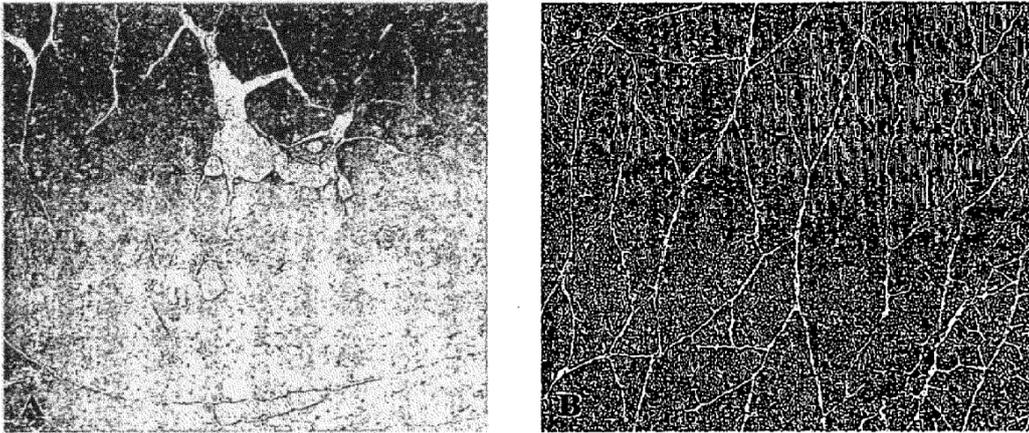


Figura 9



**Figura 10**

Pesos corporales medios de ratones BALB/c macho con células CT26 implantadas

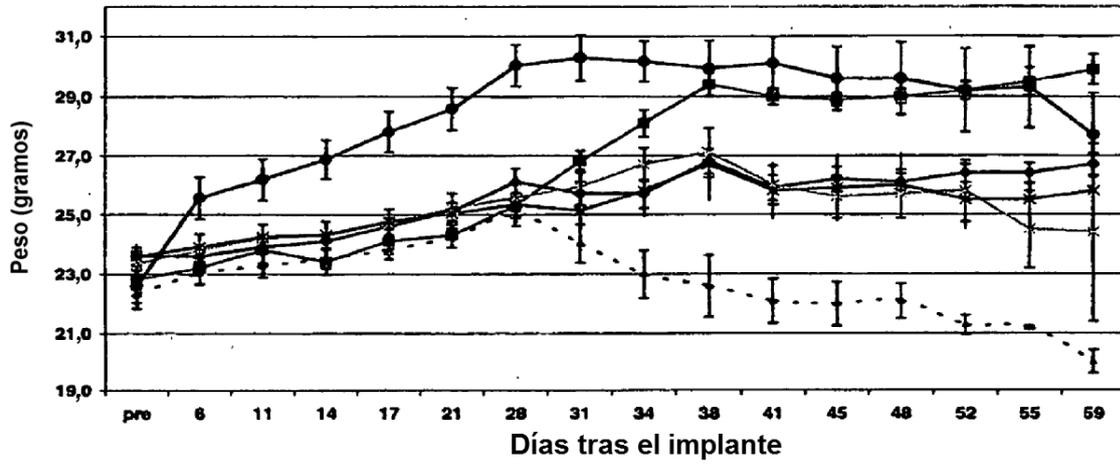


Figura 11

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

IEIVKQGCWL DDINCYRRTD CVERKDSPEV YECCEGNMC NEKFSYFPDM  
IELVKKGCWL DDFNCYDROE CVATEENPQV YECCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT  
GGPEVTYEPF PTAPT

Figura 12

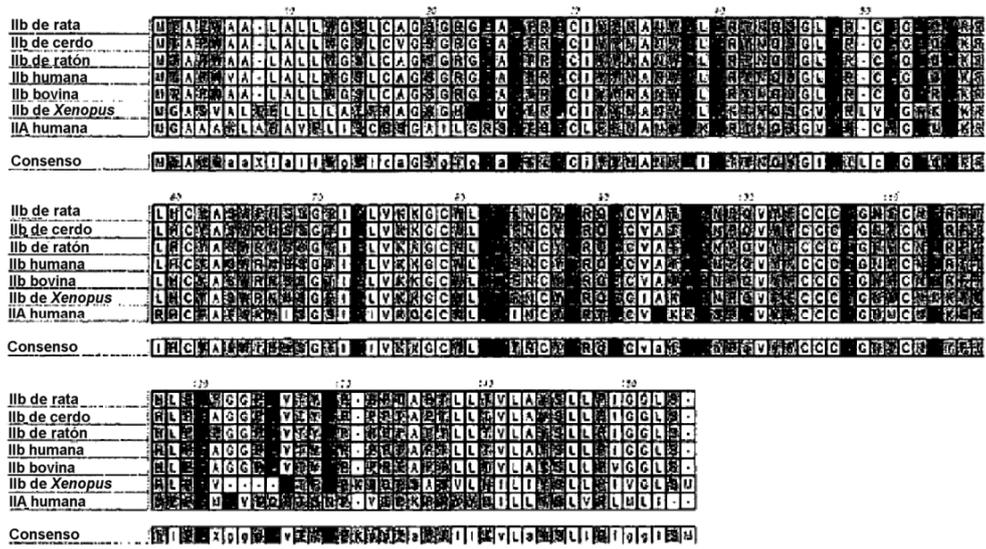


Figura 13