

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 523**

51 Int. Cl.:

A61P 19/08 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2010** **PCT/US2010/048322**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011** **WO2011031901**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010** **E 10816109 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016** **EP 2475427**

54 Título: **Antagonistas de ActRIIb y dosificación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.09.2009 US 276287 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

ACCELERON PHARMA, INC. (100.0%)
149 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

SEEHRA, JASBIR;
KNOFF, JOHN y
ATTIE, KEN

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 613 523 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

Antagonistas de ActRIIb y dosificación y usos de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] Los trastornos óseos, en el intervalo de osteoporosis a fracturas, representan un conjunto de estados patológicos para los que hay pocos agentes farmacéuticos eficaces. El tratamiento en cambio se centra en intervenciones físicas y conductuales, incluyendo inmovilización, ejercicio y cambios en la dieta. Sería beneficioso tener agentes terapéuticos que promuevan el crecimiento óseo y aumenten la densidad ósea con el fin de tratar una variedad de trastornos óseos.

[0002] El crecimiento y mineralización óseos dependen de las actividades de dos tipos celulares, osteoclastos y osteoblastos, aunque los condrocitos y células de los vasos participan también en aspectos críticos de estos procesos. En el desarrollo, la formación ósea ocurre mediante dos mecanismos, osificación endocondral y osificación intramembranosa, siendo la primera responsable de la formación de huesos longitudinales y la última responsable de la formación de huesos topológicamente planos, tales como los huesos del cráneo. La osificación endocondral requiere la formación y degradación secuencial de estructuras cartilaginosas en las placas de crecimiento que sirven como moldes para la formación de osteoblastos, osteoclastos, vasos y la posterior mineralización. Durante la osificación intramembranosa, se forma el hueso directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y la posterior deposición en matriz.

[0003] Las fracturas y otras desestabilizaciones estructurales del hueso se curan mediante un proceso que, al menos superficialmente, se parece a la secuencia de eventos de desarrollo de la osteogénesis, incluyendo la formación de tejido cartilaginoso y la posterior mineralización. El proceso de curación de fracturas puede ocurrir de dos modos. La curación de hueso directa o primaria ocurre sin formación de callo. La curación de hueso indirecta o secundaria ocurre con una etapa precursora de callo. La curación primaria de fracturas implica la reformación de la continuidad mecánica a través de una desestabilización estrechamente localizada. En condiciones adecuadas, las células resorbentes de hueso que rodean la desestabilización muestran una respuesta resorptiva de tunelación y establecen rutas para la penetración de vasos sanguíneos y la posterior curación. La curación secundaria de huesos sigue un proceso de inflamación, formación de callo blando, mineralización del callo y remodelación del callo. En la etapa de inflamación, la formación de hematoma y hemorragia es el resultado de la desestabilización de los vasos sanguíneos periosteales y endosteales en el sitio de lesión. Las células inflamatorias invaden la zona. En la etapa de formación de callo blando, las células producen nuevos vasos, fibroblastos, material intracelular y células de soporte, formando tejido de granulación en el espacio entre los fragmentos de fractura. Se establece la unión clínica a través de la desestabilización mediante tejido fibroso o cartilaginoso (callo blando). Se forman osteoblastos y median la mineralización de callo blando, que se reemplaza entonces por hueso lamelar y se somete a procesos de remodelación normales.

[0004] Además de fracturas y otras desestabilizaciones físicas de la estructura ósea, la pérdida de contenido mineral óseo y masa ósea puede estar causada por una amplia variedad de afecciones y puede dar como resultado problemas médicos significativos. Los cambios en la masa ósea ocurren de modo relativamente predecible durante la vida de un individuo. Hasta alrededor de los 30 años, los huesos tanto de hombres como de mujeres crecen hasta la masa máxima mediante el crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondrales y el crecimiento radial. Después de alrededor de los 30 años (para hueso trabecular, p.ej. huesos planos tales como vértebras y pelvis) y los 40 años (para hueso cortical, p.ej. huesos largos encontrados en los miembros), ocurre una pérdida ósea lenta tanto en hombres como en mujeres. En las mujeres, ocurre también una fase final de pérdida ósea sustancial, probablemente debida a deficiencias estrogénicas postmenopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10 % de masa ósea adicional de hueso cortical y un 25 % del compartimento trabecular. Que la pérdida ósea progresiva dé como resultado una afección patológica tal como osteoporosis depende en gran medida de la masa ósea inicial del individuo y de si hay condiciones exacerbantes.

[0005] La pérdida ósea se caracteriza a veces como un desequilibrio en el proceso de remodelación ósea normal. El hueso sano está constantemente sometido a remodelación. La remodelación empieza con la resorción del hueso por osteoclastos. El hueso resorbido se reemplaza entonces por nuevo tejido óseo, que se caracteriza por la formación de colágeno por osteoblastos y la posterior calcificación. En individuos sanos, las tasas de resorción y formación están equilibradas. La osteoporosis es una afección progresiva crónica marcada por un desplazamiento hacia la resorción, que da como resultado una disminución global de la masa ósea y la mineralización ósea. La osteoporosis en seres humanos está precedida por osteopenia clínica (una densidad mineral ósea que está más de

una desviación estándar pero menos de 2,5 desviaciones estándares por debajo del valor medio para hueso adulto joven). En el mundo, aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de osteoporosis.

[0006] Por tanto, los procedimientos para controlar el equilibrio entre actividad de osteoclastos y osteoblastos pueden ser útiles para promover la curación de fracturas y otros daños al hueso, así como el tratamiento de trastornos, tales como osteoporosis, asociados a la pérdida de masa ósea y mineralización ósea.

[0007] Con respecto a la osteoporosis, se usan como intervenciones terapéuticas todos de estrógenos, calcitonina, osteocalcina con vitamina K o altas dosis de calcio en la dieta. Otros enfoques terapéuticos a la osteoporosis incluyen bisfosfonatos, hormona paratiroidea, calcimiméticos, estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio y fluoruro de sodio. Sin embargo, dichos productos terapéuticos están a menudo asociados a efectos secundarios indeseables.

[0008] Por tanto, es un objeto de la presente divulgación proporcionar composiciones y procedimientos para promover el crecimiento y mineralización óseos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se define por las reivindicaciones.

[0010] En parte, la divulgación demuestra que pueden usarse antagonistas de ActRIIb, incluyendo moléculas basadas de ActRIIb (p.ej., moléculas que comprenden una porción de unión a ligando de un dominio extracelular de ActRIIb o una variante de la misma, tales como ActRIIb-Fc) y otros antagonistas de la señalización de ActRIIb, para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento óseo y/o aumentar la resistencia ósea. En particular, la divulgación demuestra que una forma soluble de ActRIIb promueve una densidad ósea, crecimiento óseo y resistencia ósea aumentados in vivo. Aunque la mayoría de agentes farmacéuticos que promueven el crecimiento óseo o inhiben la pérdida ósea actúan como agentes anticatabólicos (a los que se hace referencia comúnmente también como “agentes catabólicos”) (p.ej. bisfosfonatos) o agentes anabólicos (p.ej., hormona paratiroidea, PTH, cuando se dosifica apropiadamente), la proteína ActRIIb soluble exhibe una actividad dual, teniendo ambos efectos anticatabólicos y anabólicos. Por tanto, los antagonistas de ActRIIb pueden usarse para aumentar la densidad ósea y promover el crecimiento óseo. Pueden usarse también anticuerpos anti-ActRIIb y moléculas pequeñas y aptámeros orientados a ActRIIb y ácidos nucleicos que disminuyen la expresión de ActRIIb para tratar trastornos asociados a una baja densidad ósea o baja resistencia ósea, tales como osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes necesitado de ello, tal como en pacientes que tienen una fractura ósea (dichas moléculas se incluyen también en el término “antagonistas de ActRIIb” como se usa en la presente memoria). La divulgación indica además que los antagonistas de ActRIIb son eficaces para prevenir y/o reparar el daño óseo causado por tumores de mieloma múltiple y metástasis en el hueso (p.ej., en cáncer de mama, esófago, colon, próstata o pulmón) y, adicionalmente, que los antagonistas de ActRIIb disminuyen la carga tumoral en mieloma múltiple.

[0011] Los antagonistas de ActRIIb pueden usarse también para el tratamiento de una variedad de trastornos o afecciones, en particular trastornos musculares y neuromusculares (p.ej., distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular), trastornos del tejido adiposo (p.ej., obesidad), trastornos metabólicos (p.ej., diabetes de tipo 2), trastornos neurodegenerativos y consunción muscular asociada a una edad avanzada (sarcopenia), terapia de cáncer de próstata y caquexia por cáncer. En realizaciones específicas, los antagonistas de ActRIIb de la invención (p.ej., polipéptidos de ActRIIb solubles) pueden antagonizar un receptor de ActRIIb en cualquier proceso asociado a la actividad de ActRIIb. Opcionalmente, los antagonistas de ActRIIb de la invención pueden diseñarse para antagonizar preferiblemente uno o más ligandos de los receptores ActRIIb, tales como GDF8 (también llamado miostatina), GDF11, activina A, activina B, activina AB, Nodal y BMP7 (también llamado OP-1), y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales. Los ejemplos de antagonistas de ActRIIb incluyen los polipéptidos de ActRIIb de origen natural así como las variantes funcionales de los mismos.

[0012] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden un polipéptido de ActRIIb soluble. Los polipéptidos de ActRIIb pueden formularse como una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido de ActRIIb y un portador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el polipéptido de ActRIIb se une a activina con una KD menor de 1 micromolar o menor de 100, 10 o 1 nanomolar. Preferiblemente, la composición es al menos un 95 % pura, con respecto a otros componentes polipeptídicos, valorado mediante cromatografía de exclusión por tamaño y, más preferiblemente, la composición es al menos un 98 % pura. Un polipéptido de ActRIIb para uso en dicha preparación puede ser cualquiera de los divulgados en la presente memoria, tales como un polipéptido que tiene una secuencia aminoácídica seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 13,

17 o 20, o que tiene una secuencia aminoacídica que es al menos un 80, 85, 90, 95, 97 o 99 % idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20. Un polipéptido de ActRIIb puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIb natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1-3 o una secuencia de SEQ ID NO: 2 que carece de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola"). Un polipéptido de ActRIIb puede estar codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 o 5.

[0013] Un polipéptido de ActRIIb puede incluir una o más alteraciones en la secuencia aminoacídica (p.ej., en el dominio de unión a ligando) respecto a un polipéptido de ActRIIb de origen natural. Se proporcionan ejemplos de polipéptidos de ActRIIb alterados en el documento WO 2006/012627, pág. 59-60. La alteración de la secuencia aminoacídica puede alterar, por ejemplo, la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, insecto u otra eucariótica o alterar la escisión proteolítica del polipéptido respecto al polipéptido de ActRIIb de origen natural.

[0014] Un polipéptido de ActRIIb puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido de ActRIIb (p.ej., una porción de unión a ligando de un ActRIIb o variante del mismo) y uno o más dominios adicionales que proporcionen una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, orientación a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar uno o más de estabilidad in vivo, semivida in vivo, captación/administración, localización o distribución en tejido, formación de complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. La dimerización o multimerización puede proporcionar una afinidad de unión a ligando aumentada. Una proteína de fusión ActRIIb puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo silvestre o mutante) o una seroalbúmina u otra porción polipeptídica que proporcione propiedades deseables tales como farmacocinética mejorada, solubilidad mejorada o estabilidad mejorada. Típicamente, se producirá una proteína de fusión ActRIIb-Fc en forma de complejo homodimérico. Opcionalmente, una fusión ActRIIb-Fc comprende un ligador relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIb. Este ligando no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de cerca de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIb (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o de una longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente exentos de estructura secundaria, o una mezcla de ambas. Un ligador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede contener, por ejemplo, una única secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (p.ej., singletes o repeticiones de TG3, TG4, SG3 o SG4). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un marcaje epitópico, un marcaje FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIb soluble incluye uno o más residuos aminoacídicos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, 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 derivatizador orgánico. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno óseo. Preferiblemente, la preparación farmacéutica está sustancialmente exenta de pirógenos. En general, es preferible expresar la proteína ActRIIb en una línea celular de mamífero que medie adecuadamente la glicosilación natural de la proteína ActRIIb para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han usado exitosamente líneas celulares humanas y CHO, y se espera que sean útiles otros sistemas de expresión de mamífero comunes.

[0015] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de ActRIIb. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de codificación de un polipéptido de ActRIIb, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (p.ej., dominio de unión a ligando) de ActRIIb y una secuencia que codifique parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de ActRIIb, excepto por un codón de terminación colocado en el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático o colocado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia polinucleotídica de ActRIIb completa tal como la SEQ ID NO: 4 o 5, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción al menos 600 nucleótidos antes del extremo 3' o colocado de otra manera de tal modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado con una porción truncada de un ActRIIb completo. Es una secuencia de ácido nucleico preferida la SEQ ID NO: 18. Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria pueden estar ligados operativamente con un promotor para expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

[0016] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para elaborar un polipéptido de ActRIIb. Dicho procedimiento puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (p.ej., de SEQ ID NO: 4, 5 o 18) divulgados en la presente memoria en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Dicho procedimiento puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de ActRIIb, en el que dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActRIIb y b) recuperar el polipéptido de ActRIIb así expresado. Los polipéptidos de ActRIIb pueden recuperarse como fracciones brutas, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación puede conseguirse mediante una serie de etapas de purificación incluyendo, por ejemplo, una, dos o tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (p.ej., Q-Sepharose), cromatografía de interacción hidrófoba (p.ej., fenil-Sepharose), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico.

[0017] En ciertos aspectos, puede usarse un antagonista de ActRIIb divulgado en la presente memoria, tal como un polipéptido de ActRIIb, en un procedimiento para promover el crecimiento óseo o para aumentar la densidad ósea en un sujeto. En ciertos supuestos, la divulgación proporciona procedimientos para tratar un trastorno asociado a la baja densidad ósea, o para promover el crecimiento óseo, en pacientes necesitados de ello. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad eficaz de antagonista de ActRIIb. En ciertos aspectos, la divulgación proporciona usos del antagonista de ActRIIb para elaborar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en la presente memoria.

[0018] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento para la identificación de un agente que estimula el crecimiento, o la mineralización aumentada, del hueso. El procedimiento comprende: a) identificar un agente de prueba que se una a un dominio de unión a ligando de un polipéptido de ActRIIb y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento o la mineralización del hueso.

[0019] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para la dosificación a un paciente de una proteína de fusión ActRIIb-Fc, que comprenden administrar una proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente con un programa de dosificación que mantenga una concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc de al menos 8 µg/ml.

[0020] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un compuesto para uso en la dosificación a un paciente de una proteína de fusión ActRIIb-Fc, en el que la proteína de fusión ActRIIb-Fc se dosifica con un programa que mantenga una concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc de al menos 8 µg/ml. Se describen en la presente memoria y en las reivindicaciones otros compuestos, usos y regímenes de dosificación ejemplares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] La patente o presentación de solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Se proporcionarán copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo o dibujos en color por la Oficina a petición con el pago de la tarifa necesaria.

La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencia múltiple de diversas proteínas ActRIIb de vertebrados y ActRIIA humana.

La Figura 2 muestra el perfil farmacocinético (PK) de pacientes humanos para una única dosis de ActRIIb-Fc administrada por vía subcutánea.

La Figura 3 muestra el cambio porcentual medio de masa corporal magra a los 15, 29 o 57 días después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

La Figura 4 muestra el porcentaje de sujetos con un aumento $\geq 0,5$ kg (panel superior) o $\geq 1,0$ kg (panel inferior) de masa corporal magra a los 15, 29 o 57 días después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

La Figura 5 muestra el cambio de leptina, un biomarcador sérico de metabolismo graso, en diversos puntos temporales después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

La Figura 6 muestra el cambio de adiponectina, un biomarcador sérico de metabolismo graso, en diversos puntos temporales, después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

La Figura 7 muestra el cambio porcentual medio de fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP), un biomarcador sérico de formación ósea, en diversos puntos temporales después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

La Figura 8 muestra el cambio porcentual medio de telopéptido de colágeno de tipo 1 C-terminal (CTX), un

biomarcador sérico de resorción ósea, en diversos puntos temporales después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

La Figura 9 muestra el cambio porcentual medio de hormona estimulante de folículo (FSH) en diversos puntos temporales después de administración subcutánea a pacientes humanos de una única dosis de ActRIIb-Fc.

5 La Figura 10 muestra un barrido de imagenología de resonancia magnética (IRM) de una sección transversal de muslo de un sujeto humano representativo dosificado con una única administración subcutánea de 3 mg/kg de ActRIIb-Fc. El panel superior muestra la evaluación por IRM de un muslo, el panel medio muestra el valor basal el día 9 y el panel inferior muestra los resultados el día 29 después de la dosificación. Se muestra el músculo en gris, la grasa subcutánea en rosa y la grasa intramuscular en verde.

10 La Figura 11 muestra el cambio porcentual medio desde el valor basal del volumen de músculo de muslo el día 29 para sujetos humanos dosificados con una única administración subcutánea de ActRIIb-Fc 1 mg/kg o ActRIIb-Fc 3 mg/kg en comparación con placebo.

La Figura 12 muestra un alineamiento de la secuencia señal y el dominio extracelular de ActRIIb de SEQ ID NO: 1 (residuos 1-134 de SEQ ID NO: 1) con el dominio extracelular de ActRIIb como se representa por la SEQ ID NO: 2.

15 Como se muestra, la secuencia señal es de 19 aminoácidos de longitud. Por lo tanto, un aminoácido en posición X en la SEQ ID NO: 1 tiene la correspondiente posición en X-19 en la SEQ ID NO: 2. Para ilustrar, la posición aminoacídica 30 en la SEQ ID NO: 1 es la posición aminoacídica 11 en la SEQ ID NO: 2. Puede determinarse una correlación similar para otras secuencias de ActRIIb descritas en la presente memoria.

La Figura 13 muestra un alineamiento de ActRIIa y ActRIIb humanos. Los residuos en cuadros representan los residuos aminoacídicos que se cree que contactan directamente con el ligando (concretamente, el bolsillo de unión a ligando) basándose en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIb y ActRIIa.

La Figura 14 muestra el perfil farmacocinético de ActRIIb-hFc en el suero en diversos días durante el estudio de dosis ascendente múltiple descrito en el Ejemplo 5.

La Figura 15 muestra las concentraciones séricas de ActRIIb-hFc en el eje superior y el cambio porcentual de hormona estimulante de folículo (FSH) en el eje inferior.

La Figura 16 muestra el cambio porcentual de la masa corporal magra total causado por dosis variables de ActRIIb-hFc, medido por DXA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30

1. Visión general

[0022] 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. Estas proteínas son conocidas por ejercer efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia efectúan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejido y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. Al manipular la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en el organismo. Por ejemplo, las razas de ganado vacuno piamontesa y belga azul portan una mutación con pérdida de función en el gen de GDF8 (también llamada miostatina) que causa un notable aumento de la masa muscular. Grobet y col., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4. Además, en seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados a una masa muscular aumentada y, supuestamente, una fuerza excepcional. Schuelke y col., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

45

[0023] Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Hay tres formas de activina principales (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta\alpha\beta A$, $\beta\beta\beta B$ y $\beta\alpha\beta B$). El genoma humano codifica también una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado. En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células de ovario y placenta, soportar la supervivencia de células neuronales, influir en la progresión del ciclo celular positiva o negativamente dependiendo del tipo celular e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibio (DePaolo y col., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198: 500-512; Dyson y col., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963). Además, se ha encontrado que el factor de diferenciación eritroide (EDF), aislado de células de leucemia monocítica humana estimuladas, era idéntico a la activina A (Murata y col., 1988, PNAS, 85: 2434). Se ha sugerido que la activina A actúa como un regulador positivo natural de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina se antagonista por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de hormona estimulante de folículo (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina evita la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que

pueden regular la bioactividad de activina y/o unirse a activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP) y macroglobulina $\alpha 2$.

[0024] Las señales de la familia de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteína Smad posteriores tras estimulación de ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad por serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I son esenciales para señalización, y los receptores de tipo II se requieren para la unión de ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión a ligando, dando como resultado la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

[0025] Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIa y ActRIIb, como los receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65: 973-982; Attisano y col., 1992, Cell 68: 97-108). Aparte de las activinas, ActRIIa y ActRIIb pueden interaccionar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , incluyendo BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita y col., 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 y col., 2002, Genes Dev. 16: 2749-54). ALK4 es el receptor de tipo I principal para activinas, particularmente para activina A, y ALK-7 puede servir como receptor para activinas también, particularmente para activina B.

[0026] Como se demuestra en la presente memoria, un polipéptido de ActRIIb (ActRIIb[20-134]-Fc) es eficaz para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea in vivo, mientras que aumenta también la masa muscular. Aun sin desear ligarse a mecanismo particular alguno, se espera que el efecto de ActRIIb sobre el hueso esté causado principalmente por un efecto antagonista de activina. Independientemente del mecanismo, resulta evidente a partir de los datos presentados en la presente memoria que los antagonistas de ActRIIb aumentan la densidad ósea y afectan a los biomarcadores óseos de manera que es consistente con un efecto anabólico/antirresortivo combinado en seres humanos. Debería señalarse que el hueso es un tejido dinámico, con crecimiento o contracción y densidad aumentada o disminuida dependiendo de un equilibrio de factores que producen hueso y estimulan la mineralización (principalmente osteoblastos) y factores que destruyen y desmineralizan el hueso (principalmente osteoclastos). El crecimiento y mineralización óseos pueden aumentarse aumentando los factores productivos, disminuyendo los factores destructivos o ambos. Los términos "promueve el crecimiento óseo" y "aumenta la mineralización ósea" hacen referencia a los cambios físicos observables en el hueso y se pretende que sean neutros en cuanto al mecanismo mediante el que ocurren los cambios en el hueso.

[0027] Además de promover el crecimiento óseo, la divulgación contempla usar los antagonistas de ActRIIb en el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones que están asociadas a una actividad anormal de ActRIIb o un ligando de ActRIIb. Por ejemplo, los antagonistas de ActRIIb pueden usarse para tratar trastornos o afecciones humanos o animales. Los ejemplos de dichos trastornos o afecciones incluyen, pero sin limitación, trastornos metabólicos tales como diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (p.ej. síndrome X) y resistencia a insulina inducida por traumatismo (p.ej., quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (p.ej., obesidad); trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia orgánica; fragilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de consunción muscular. Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en ancianos y/o mujeres postmenopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; artrosis y fracturas relacionadas con osteoporosis. Todavía otros ejemplos incluyen baja masa ósea debida a terapia con glucocorticoides crónica, insuficiencia gonadal prematura, supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa.

[0028] Esta divulgación proporciona procedimientos para usar polipéptidos de ActRIIb y otros antagonistas de ActRIIb para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea en seres humanos, y también para aumentar la masa muscular. Los antagonistas de ActRIIb incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb de unión a ligando (p.ej., ActRIIb-Fc), anticuerpos que se unen a ActRIIb y desestabilizan la unión de uno o más ligandos, tales como activina o miostatina, proteínas no de anticuerpo seleccionadas por unión a ActRIIb (véanse, p.ej., los documentos WO/2002/088171, WO/2006/055689 y WO/2002/032925 para ejemplos de dichas proteínas y procedimientos para el diseño y la selección de las mismas), péptidos aleatorios seleccionados por unión a ActRIIb, a menudo fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a ActRIIb, especialmente sustancias de unión a activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (p.ej., un receptor de activina de tipo I soluble) y tipo II (p.ej. un receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, pueden ligarse

conjuntamente creando una molécula de unión bifuncional. Los aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización de ActRIIb están incluidos como antagonistas de ActRIIb.

[0029] Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la materia, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación o en otro lugar de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al facultativo en la descripción de las composiciones de la invención y cómo elaborarlas y usarlas. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en que se use el término.

[0030] “Alrededor de” y “aproximadamente” y significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Típicamente, los grados ejemplares de error están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10 % y más preferiblemente dentro del 5 % de un valor dado o intervalo de valores.

[0031] Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, los términos “alrededor de” y “aproximadamente” pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente memoria son aproximadas a menos que se afirme otra cosa, lo que significa que el término “alrededor de” o “aproximadamente” puede deducirse cuando no se afirma expresamente.

[0032] Los procedimientos de la divulgación pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, incluyendo una secuencia de tipo silvestre con una o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineamientos de secuencias poliméricas, p.ej., usando programas y/o algoritmos de alineamiento de secuencia que son bien conocidos en la materia (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). El especialista en la materia puede apreciar fácilmente que, en dichos alineamientos, cuando una mutación contiene una inserción o delección de residuo, el alineamiento de secuencia introducirá un “hueco” (representado típicamente por un guion, o “A”) en la secuencia polimérica que no contiene el residuo insertado o eliminado.

[0033] “Homólogo”, en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, hace referencia 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 de codificación) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, tanto en términos de identidad porcentual como por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

[0034] El término “similitud de secuencia”, en todas sus formas gramaticales, hace referencia al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácido nucleico o aminoacídicas que pueden compartir o no un origen evolutivo común.

[0035] Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término “homólogo”, cuando se modifica con un adverbio tal como “altamente”, puede hacer referencia a similitud de secuencia y puede referirse o no a un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos de ActRIIb

[0036] La presente invención se refiere a polipéptidos de ActRIIb. Como se usa en la presente memoria, el término “ActRIIb” hace referencia a una familia de proteínas receptores de activina de tipo IIb (ActRIIb) de cualquier especie y a variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIb por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIb en la presente memoria se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia de ActRIIb son generalmente proteínas transmembrana compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina cinasa predicha.

[0037] El término “polipéptido de ActRIIb” incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia de ActRIIb, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retenga una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO/2006/012627.

[0038] Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIb incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIb conocida que tengan una secuencia al menos alrededor de un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIb, y opcionalmente al menos un 85, 90, 95, 97, 99 % o más identidad. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIb de la invención puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIb. Un polipéptido de ActRIIb puede seleccionarse por la actividad promotora de la formación de glóbulos rojos sanguíneos in vivo. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIb incluyen polipéptidos precursores de ActRIIb humana (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos de ActRIIb humana solubles (p.ej., SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20).

10 **[0039]** La secuencia de la proteína precursora de ActRIIb humana es como sigue:

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERC
EGEQDKRLH**CYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERF**THLPEAGGPEVTYEPPTAPT**LLTVLAYSLLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNECHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

[0040] El péptido señal está subrayado, el dominio extracelular está en negrita y los sitios de glicosilación N-
 15 ligada potencial están en cuadros.

[0041] La secuencia polipeptídica procesada soluble de ActRIIb humana (extracelular) es como sigue:

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLH****CYASWANSSG**
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**VYFCCCEGNFCNERF****THLP**
EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

20

[0042] En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N. La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia Δ15) es como sigue:

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLH****CYASWANSSG**
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**VYFCCCEGNFCNERF****THLP**
 EA (SEQ ID NO: 3)

25

[0043] En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N. La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIb humana es como sigue: (nucleótidos 5-1543 de la entrada NM_001106 de Genbank)

30

ES 2 613 523 T3

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACCTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTCTCATACTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG

CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAA
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCC
 CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

[0044] La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido soluble de ActRIIb humana (extracelular) es como sigue:

5

TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCA
 ACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG
 CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCT
 GGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT
 GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTA
 CTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTG
 CCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCC
 CCACC (SEQ ID NO: 5)

[0045] La invención se refiere a polipéptidos de ActRIIb solubles. Como se describe en la presente memoria, el término "polipéptido de ActRIIb soluble" hace referencia generalmente a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIb. El término "polipéptido de ActRIIb soluble", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIb así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Es un polipéptido de ActRIIb de unión a activina aquel que retiene la capacidad de unirse a activina incluyendo, por ejemplo, activina AA, AB, BB o formas que incluyen una subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIb de unión a activina se unirá a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menos. El dominio extracelular de una proteína ActRIIb se une a activina y es generalmente soluble en condiciones fisiológicas, y por tanto puede denominarse un polipéptido de ActRIIb soluble de unión a activina. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIb de unión a activina solubles incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20. Se hace referencia a la SEQ ID NO: 13 como ActRIIb(20-134)-hFc, y se describe además en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos de ActRIIb solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIb, por ejemplo, la secuencia líder de melitina de abeja melífera (SEQ ID NO: 14), la líder de activador de plasminógeno de tejido (TPA) (SEQ ID NO: 15) o la líder nativa de ActRIIb (SEQ ID NO: 16). El polipéptido ActRIIb-hFc ilustrado en la SEQ ID NO: 17 usa una líder de TPA.

[0046] En ciertas realizaciones, la invención se refiere a polipéptidos variantes de ActRIIb (p.ej., polipéptidos de ActRIIb solubles). Opcionalmente, los fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas tienen la misma o similares actividades biológicas que sus correspondientes polipéptidos de ActRIIb de tipo silvestre. Por ejemplo, una variante de ActRIIb de la invención puede unirse a e inhibir la función de un ligando de ActRIIb (p.ej., activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIb modula el crecimiento de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo o grasa. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIb

incluyen polipéptido precursor de ActRIIb humana (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos de ActRIIb humana solubles (p.ej., las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20).

[0047] A menos que se afirme otra cosa, las posiciones aminoacídicas en el polipéptido de ActRIIb discutido en la presente memoria se realizan con referencia al polipéptido precursor de ActRIIb (concretamente, la SEQ ID NO: 1). Debería entenderse que puede identificarse fácilmente la correspondiente posición en otro polipéptido de ActRIIb basándose en la información proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, el polipéptido precursor de ActRIIb contiene una secuencia líder de 19 aminoácidos que no está contenida en la porción extracelular soluble de ActRIIb como se muestra en la SEQ ID NO: 2. Por consiguiente, un residuo en posición X de la SEQ ID NO: 1 corresponde a un residuo X-19 en la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, el residuo 30 de la SEQ ID NO: 1 corresponde al residuo 11 de la SEQ ID NO: 2 (véase la Figura 12). Puede determinarse una correlación similar para otras secuencias de ActRIIb descritas en la presente memoria.

[0048] La divulgación identifica porciones y variantes funcionalmente activas de ActRIIb. Los solicitantes han establecido que una proteína de fusión con Fc que tiene la secuencia divulgada por Hilden y col. (Blood. 15 de abril de 1994; 83(8): 2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la SEQ ID NO: 1 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. En contraposición, la misma proteína de fusión con Fc con una arginina en posición 64 (R64) tiene una afinidad por activina y GDF-11 en el intervalo de nanomolar bajo a picomolar alto. Por lo tanto, se usa una secuencia con R64 como secuencia de referencia de tipo silvestre para ActRIIb humana en esta divulgación.

[0049] Attisano y col. (Cell. 10 de enero de 1992; 68(1): 97-108) mostraron que una delección en el nudo de prolina del extremo C del dominio extracelular de ActRIIb reducía la afinidad del receptor por activina. Una proteína de fusión ActRIIb-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 1, "ActRIIb(20-119)-Fc", tiene una unión reducida a GDF-11 y activina respecto a una ActRIIb(20-134)-Fc que incluye la región de nudo de prolina y el dominio yuxtamembranoso completo (véase la publicación de EE.UU. n° 2009/0005308). Sin embargo, una proteína ActRIIb(20-129)-Fc retiene una actividad similar pero algo reducida respecto al tipo silvestre, aunque la región de nudo de prolina esté desestabilizada. Por tanto, se espera que los dominios extracelulares de ActRIIb que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 sean todos activos, pero los constructos que se detienen en 134 o 133 pueden ser los más activos. De forma similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión a ligando por grandes márgenes. En apoyo de esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión a ligando. Por lo tanto, una proteína de fusión ActRIIb-Fc puede terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión a ligando reducida. El aminoácido 119 está mal conservado y así se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o después retienen actividad de unión a ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Se ha reseñado que ActRIIb(25-118)-hFc es eficaz para inhibir la activina y otros ligandos y para promover la masa muscular y, por consiguiente, dichas proteínas ActRIIb-hFc truncadas pueden usarse en los procedimientos descritos en la presente memoria (véase Zhou y col., 2010, Cell 142: 531-543). Puede ser deseable usar cualquiera de estas formas, dependiendo de la situación clínica o experimental.

[0050] En el extremo N de ActRIIb, se espera que una proteína que empieza en el aminoácido 29 o antes retenga 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 glicosilación N-ligada sin afectar sustancialmente a la unión a ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido señal de escisión y la región reticulada con cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29, son bien toleradas. En particular, los constructos que empiezan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 retendrán actividad, y los constructos que empiezan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 se espera que retengan también actividad. Un constructo que empieza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la máxima actividad (véase la publicación de EE.UU. n° 2009/0005308).

[0051] Tomado en conjunto, una porción activa de ActRIIb comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, y los constructos pueden empezar, por ejemplo, en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen constructos que empiezan en una posición 20-29 o 21-29 y terminan en una posición 118-134, 118-133, 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133. Otros ejemplos incluyen constructos que empiezan en una posición 20-24 (o 21-24, o 22-25) y terminan en una posición 109-134 (o 109-133), 118-134 (o 118-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133). Se contemplan también variantes dentro de estos intervalos, particularmente aquellas que tienen al menos un 80, 85, 90, 95 o 99 % de identidad con la correspondiente porción de SEQ ID NO: 2.

- [0052]** Se proporciona un análisis extenso del análisis de estructura-función de ActRIIb en la publicación de EE.UU. nº 2009/0005308. Los residuos de ActRIIb que están probablemente en contacto con ligandos en el bolsillo de unión se han definido como los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101 de la SEQ ID NO: 1. En estas posiciones, se espera que las mutaciones conservativas sean toleradas, aunque una mutación K74A está bien tolerada, como R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es K en *Xenopus*, indicando que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIb bovina y K en ActRIIb de *Xenopus*, y por lo tanto los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Aparte de estos residuos, se espera que las modificaciones sean relativamente bien toleradas, a condición de que dichas alteraciones no desestabilicen la estructura de la proteína en conjunto. Es fácilmente evidente cuándo se desestabiliza la estructura de la proteína, porque la proteína tenderá a expresarse mal o a degradarse en el medio de cultivo. Por tanto, es una fórmula general para una proteína variante de ActRIIb activa aquella que comprende los aminoácidos 29-109, pero que empieza opcionalmente en una posición en el intervalo de 20-24 o 22-25 y termina en una posición en el intervalo de 129-134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios aminoacídicos conservativos en el bolsillo de unión a ligando y 0, 1 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 retener más de un 80, 90, 95 o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1. Los sitios fuera del bolsillo de unión, cuya variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se señala anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73 de la SEQ ID NO: 1. Una alteración de asparagina a alanina en posición 65 (N65A) mejora realmente la unión a ligando en el fondo de A64, y se espera por tanto que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión a ligando en el fondo de R64. Este cambio elimina probablemente la glicosilación en N65 en el fondo de A64, demostrando por tanto que es probable que sea tolerado un cambio significativo en esta región. Aunque un cambio R64A es mal tolerado, R64K es bien tolerado y por tanto puede tolerarse otro residuo básico, tal como H, en la posición 64.
- [0053]** La ActRIIb está bien conservada entre casi todos los vertebrados, con grandes tramos de dominio extracelular conservados completamente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIb están también altamente conservados. Por consiguiente, las comparaciones de secuencias de ActRIIb de diversos organismos vertebrados proporcionan conocimientos sobre los residuos que pueden alterarse. Por lo tanto, una variante de ActRIIb humana activa puede incluir uno o más aminoácidos en las correspondientes posiciones de la secuencia de otra ActRIIb de vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de la secuencia humana o de otro vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante de ActRIIb activa. L46 de ActRIIb humana es una valina en ActRIIb de *Xenopus*, y así esta posición puede alterarse, y puede alterarse opcionalmente a otro residuo hidrófobo tal como V, I o F, o un residuo no polar tal como A. E52 de ActRIIb humana es K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que este sitio puede ser tolerante a una amplia variedad de cambios, incluyendo residuos polares tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 de ActRIIb humana es K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que se tolera en esta posición una amplia variación estructural, favoreciendo los residuos polares tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 de ActRIIb humana es Y en ActRIIb de *Xenopus*, y por lo tanto debería tolerar Y u otro grupo hidrófobo tal como I, V o L. E111 de ActRIIb humana es K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que se tolerarán residuos cargados en esta posición, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 de ActRIIb humana es K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que se toleran residuos básicos en esta posición, incluyendo R y H. A en posición 119 de ActRIIb humana está relativamente mal conservada, y aparece como P en ActRIIb de roedor y como V en ActRIIb de *Xenopus*, por tanto debería tolerarse esencialmente cualquier aminoácido en esta posición.
- [0054]** La adición de un sitio de glicosilación N-ligado adicional (N-X-S/T) aumenta la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIb-Fc respecto a la forma ActRIIb(R64)-Fc (véase la publicación de EE.UU. nº 2009/0005308). Al introducir una asparagina en posición 24 (constructo A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una semivida más larga. Se encuentran otras secuencias NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS) de la SEQ ID NO: 1, aunque esta última puede no glicosilarse eficazmente con R en posición 64. Las secuencias N-X-S/T pueden introducirse generalmente en posiciones fuera del bolsillo de unión a ligando definido en la Figura 13. 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 de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias N-X-S/T pueden introducirse también en el ligador entre la secuencia de ActRIIb y Fc u otro componente de fusión. Dicho sitio puede introducirse con un esfuerzo mínimo introduciendo N en la posición correcta con respecto a S o T preexistentes, o introduciendo S o T en una posición correspondiente a N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación N-ligado son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinada con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se prediga glicosilado puede alterarse a T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección facilitada por la glicosilación. Igualmente, cualquier T que se prediga glicosilado puede alterarse a S. Por tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Igualmente, en una variante A24N, puede usarse una alteración S26T. Por consiguiente, una variante ActRIIb puede

incluir una o más secuencias de consenso de glicosilación N-ligadas no endógenas adicionales.

- [0055]** La posición L79 puede alterarse para conferir propiedades de unión a activina-miostatina alteradas (GDF-11). L79A o L79P reducen la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D retienen la unión a GDF-11. Notablemente, las variantes L79E y L79D tienen una actividad de unión a activina reducida en gran medida. Los experimentos in vivo indican que estos receptores no de activina retienen una capacidad significativa de aumentar la masa muscular pero muestran efectos disminuidos sobre otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad de obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina.
- [0056]** Las variaciones descritas pueden combinarse de diversos modos. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descrito en la presente memoria indican que hay posiciones aminoacídicas en ActRIIb que a menudo es beneficioso conservar. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo, y particularmente triptófano), la posición 37 (ácido, y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico) y la posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por tanto, en cada una de las variantes divulgadas en la presente memoria, la divulgación proporciona un armazón de aminoácidos que puede conservarse. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido) y 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).
- [0057]** En ciertas realizaciones, pueden obtenerse fragmentos aislados de los polipéptidos de ActRIIb cribando los polipéptidos producidos recombinantemente a partir del correspondiente fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRIIb (p.ej. las SEQ ID NO: 4 y 5). Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la materia tales como la química de f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos pueden producirse (recombinantemente o por síntesis química) y ensayarse para identificar aquellos fragmentos peptídicos que puedan funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIb o un ligando de ActRIIb.
- [0058]** En ciertas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos de ActRIIb tiene una secuencia aminoacídica que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia aminoacídica al menos un 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20.
- [0059]** En ciertos supuestos, la presente divulgación contempla elaborar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido de ActRIIb para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica o la estabilidad (p.ej., la vida útil ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Pueden producirse también polipéptidos de ActRIIb modificados, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (p.ej., mutaciones conservativas) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Puede determinarse fácilmente si un cambio en la secuencia aminoacídica de un polipéptido de ActRIIb da como resultado un homólogo funcional valorando la capacidad del polipéptido de ActRIIb variante de producir una respuesta en células de forma similar al polipéptido de ActRIIb de tipo silvestre, o de unirse a uno o más ligandos tales como activina, GDF11 o miostatina, de forma similar al tipo silvestre.
- [0060]** En ciertos supuestos específicos, la presente divulgación contempla hacer mutaciones en el dominio extracelular (al que se hace referencia también como dominio de unión a ligando) de un polipéptido de ActRIIb de tal modo que el polipéptido de ActRIIb variante (o mutante) tenga actividades de unión a ligando alteradas (p.ej., afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, dichos polipéptidos de ActRIIb variantes tienen una afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos de ActRIIb variantes tienen una especificidad de unión alterada por sus ligandos.
- [0061]** Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos de ActRIIb variantes que se unen preferiblemente a GDFB/GDF11 respecto a activinas. La divulgación establece además la conveniencia de dichos polipéptidos para reducir los efectos indeseados, aunque dichas variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves donde pueden necesitarse grandes ganancias de masa muscular para efecto terapéutico y donde es aceptable cierto nivel de efectos indeseados. Por ejemplo, los residuos aminoacídicos de la proteína ActRIIb, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, están en el bolsillo de unión a ligando y median la unión

a sus ligandos tales como activina y GDF8. Por tanto, la presente invención proporciona un dominio de unión a ligando alterado (p.ej., dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIb que comprende una o más mutaciones en esos residuos aminoacídicos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada por un ligando tal como GDF8 respecto a un dominio de unión a ligando de tipo silvestre de un receptor ActRIIb. Para ilustrar, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado por GDF9 frente a activina. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de K_d por unión a activina a K_d por unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor respecto a la relación por el dominio de unión a ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de CI50 para inhibir activina a CI50 para inhibir GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor respecto al dominio de unión a ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8 con una CI50 al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menor que la CI50 para inhibir activina.

[0062] Como ejemplo específico, el residuo aminoacídico cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIb puede mutar a un residuo aminoacídico diferente de tal modo que el polipéptido de ActRIIb variante se una preferiblemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo aminoacídico seleccionado del grupo consistente en: un residuo aminoacídico no cargado, un residuo aminoacídico negativo y un residuo aminoacídico hidrófobo. Como ejemplo específico adicional, el residuo hidrófobo L79 puede alterarse a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la actividad de unión a activina reteniendo la unión a GDF11. Como se reconocerá por un especialista en la materia, la mayoría de las mutaciones, variaciones o modificaciones descritas pueden hacerse a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraducciona l o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia.

[0063] En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos de ActRIIb de la invención para alterar la glicosilación del polipéptido. Los sitios de glicosilación ejemplares en los polipéptidos de ActRIIb se muestran en la SEQ ID NO: 1. Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación O-ligados o N-ligados. Los sitios de reconocimiento de la glicosilación ligados a asparagina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración puede hacerse también mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido de ActRIIb de tipo silvestre (para los sitios de glicosilación O-ligados). Una variedad de sustituciones o deleciones aminoacídicas en una o ambas de la primera o tercera posiciones aminoacídicas de un sitio de reconocimiento de la glicosilación (y/o la delección aminoacídica en la segunda posición) da como resultado la no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en un polipéptido de ActRIIb es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos con el polipéptido de ActRIIb. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, puede enlazarse el azúcar o azúcares con (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306.

[0064] La retirada de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido de ActRIIb puede lograrse química y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de ActRIIb al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar ligador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) mientras que deja la secuencia aminoacídica intacta. La desglicosilación química se describe además por Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y por Edge y col. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de los restos carbohidrato en polipéptidos de ActRIIb puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endo-y exoglicosidasas como se describen por Thotakura y col. (1987) Meth. Enzymol. 138: 350. La secuencia de un polipéptido de ActRIIb puede ajustarse, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y planta pueden introducir todas diferentes patrones de glicosilación que pueden afectarse por la secuencia aminoacídica del péptido. En general, las proteínas ActRIIb para uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporcione una glicosilación apropiada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que sean también útiles otras líneas celulares de expresión de mamífero.

[0065] Esta divulgación contempla además un procedimiento de generación de variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido de ActRIIb, que incluyen, opcionalmente, variantes de

truncamiento; las combinaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El fin de cribar dichas colecciones combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptido de ActRIIb que tengan propiedades alteradas, tales como una farmacocinética alterada o una unión a ligando alterada. Se proporcionan a continuación una variedad de ensayos de cribado, y dichos ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, puede cribarse en una variante de polipéptido de ActRIIb la capacidad de unirse a un polipéptido de ActRIIb para evitar la unión de un ligando de ActRIIb a un polipéptido de ActRIIb.

[0066] La actividad de un polipéptido de ActRIIb o sus variantes puede ensayarse también en un ensayo basado en células o in vivo. Por ejemplo, puede valorarse el efecto de una variante de polipéptido de ActRIIb sobre la expresión de genes implicados en la producción ósea en un osteoblasto o precursor. Esto puede efectuarse, como sea necesario, en presencia de una o más proteínas ligandos de ActRIIb recombinantes (p.ej., BMP7), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido de ActRIIb y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRIIb. Igualmente, puede administrarse un polipéptido de ActRIIb a un ratón u otro animal, y pueden valorarse una o más propiedades óseas, tales como densidad o volumen. Puede evaluarse también la tasa de curación para fracturas óseas. De forma similar, puede ensayarse la actividad de un polipéptido de ActRIIb o sus variantes en células musculares, adipocitos y células neuronales para cualquier efecto sobre el crecimiento sobre estas células, por ejemplo, mediante ensayos como los descritos a continuación. Dichos ensayos son bien conocidos y rutinarios en la materia. Puede usarse un gen informador sensible a SMAD en dichas líneas celulares para monitorizar los efectos sobre la señalización posterior.

[0067] Pueden generarse variantes derivadas combinatoriamente que tienen una potencia selectiva respecto a un polipéptido de ActRIIb de origen natural. Dichas proteínas variantes, cuando se expresan a partir de constructos de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Igualmente, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes a la correspondiente a un polipéptido de ActRIIb de tipo silvestre. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que dan como resultado la destrucción, o inactivación de otro modo, de un polipéptido de ActRIIb nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido de ActRIIb modulando la semivida de los polipéptidos de ActRIIb. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando es parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido de ActRIIb recombinante en la célula.

[0068] En ciertas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIb de la invención pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos de ActRIIb. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de ActRIIb modificados pueden contener elementos no aminoacídicos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de un polipéptido de ActRIIb pueden ensayarse como se describe en la presente memoria para otras variantes de polipéptido de ActRIIb. Cuando se produce un polipéptido de ActRIIb en células por escisión de una forma naciente del polipéptido de ActRIIb, el procesamiento postraduccional puede ser también importante para un plegamiento y/o función correctos de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, y pueden elegirse para asegurar la modificación y procesamiento correctos de los polipéptidos de ActRIIb.

[0069] En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de ActRIIb incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ActRIIb y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios incluyen, pero sin limitación, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S-transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (p.ej., un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. El dominio de fusión puede seleccionarse para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el fin de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen), útiles con copartícipes de fusión (HIS6). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de ActRIIb. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p.ej., GFP) así como "marcajes epitópicos", que son habitualmente secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Los marcajes epitópicos bien conocidos para los que están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina de virus de la gripe (HA) y marcajes c-myc. En algunos

casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión por proteasa, tal como para factor Xa o trombina, que permite a la proteasa relevante digerir las proteínas de fusión y liberar así las proteínas recombinante de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertos supuestos preferidos, se fusiona un polipéptido de ActRIIb con un dominio que estabiliza el polipéptido de ActRIIb in vivo (un dominio "estabilizador"). Se entiende por "estabilizar" cualquier cosa que aumente la semivida sérica, independientemente de si es debido a una destrucción disminuida, un aclaramiento disminuido por el riñón u otro efecto farmacocinético. Las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina son conocidas por conferir propiedades farmacocinéticas deseables a un amplio intervalo de proteínas. Igualmente, las fusiones con seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios de multimerización (p.ej., dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento muscular).

[0070] Como ejemplo específico, la presente invención proporciona una proteína de fusión de la invención como antagonista de GDF8 que comprende un dominio extracelular (p.ej., de unión a GDF-8) fusionado con un dominio Fc (p.ej., SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK

[0071] Preferiblemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos 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., mutación en Asp-256) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fcγ respecto al dominio Fc de tipo silvestre. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p.ej., mutación en Asn-434) tiene una capacidad aumentada de unión al receptor de Fc relacionado con MHC de clase I (FcRN) respecto al dominio Fc de tipo silvestre.

[0072] Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden disponerse de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, puede situarse un polipéptido de ActRIIb C-terminal a un dominio heterólogo o, como alternativa, puede situarse un dominio heterólogo C-terminal a un polipéptido de ActRIIb. El dominio de polipéptido de ActRIIb y el dominio heterólogo no tienen que estar adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias aminoácidas adicionales C- o N-terminales a cualquier dominio o entre los dominios.

[0073] En ciertos supuestos, los polipéptidos de ActRIIb de la presente divulgación contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de ActRIIb. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la semivida in vitro de los polipéptidos de ActRIIb, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos de ActRIIb o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de ActRIIb. Dichas modificaciones estabilizantes incluyen, pero sin limitación, proteínas de fusión (incluyendo por ejemplo proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de ActRIIb y un dominio estabilizante), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo por ejemplo la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de ActRIIb) y modificaciones del resto carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la retirada de restos carbohidrato de un polipéptido de ActRIIb). En el caso de proteínas de fusión, se fusiona un polipéptido de ActRIIb con un dominio estabilizante tal como una molécula de IgG (p.ej., un dominio Fc). Como se usa en la presente memoria, el término "dominio estabilizante" no solo hace referencia a un dominio de fusión (p.ej., Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino que incluye también modificaciones no proteicas tales como un resto carbohidrato o un polímero no proteico tal como polietilenglicol.

[0074] La presente invención pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de polipéptidos de ActRIIb de la invención que se aíslan de, o están sustancialmente exentos de otro modo de, otras proteínas. Los polipéptidos de ActRIIb se producirán generalmente mediante expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

[0075] En ciertos supuestos, los polipéptidos de ActRIIb (no modificados o modificados) de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, dichos polipéptidos de ActRIIb pueden sintetizarse usando técnicas de química de proteínas estándares tales como aquellas descritas en Bodansky, M. "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G. A. (ed.), "Synthetic Peptides: A User's Guide", W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, están comercialmente

disponibles sintetizadores peptídicos automáticos (p.ej., Advanced ChemTech modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). Como alternativa, los polipéptidos de ActRIIb, fragmentos o variantes de los mismos pueden producirse recombinantemente usando diversos sistemas de expresión (p.ej., E. coli, células de ovario de hámster chino, células COS, baculovirus) como es bien conocido en la materia (véase también a continuación). En una realización adicional, los polipéptidos de ActRIIb no modificados o modificados pueden producirse mediante la digestión de polipéptidos de ActRIIb completos de origen natural o producidos recombinantemente usando, por ejemplo, una proteasa, p.ej. tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima conversora de aminoácidos básicos apareados (PACE). Puede usarse el análisis informático (usando un software comercialmente disponible, p.ej., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar los sitios de escisión proteolítica. Como alternativa, dichos polipéptidos de ActRIIb pueden producirse a partir de polipéptidos de ActRIIb completos de origen natural o producidos recombinantemente tales como técnicas estándares conocidas en la materia, tales como escisión química (p.ej., bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de ActRIIb

[0076] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos de ActRIIb (p.ej., polipéptidos de ActRIIb completos y solubles), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión divulgados en la presente memoria. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIb humana de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIb. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para la elaboración de polipéptidos de ActRIIb o como agentes terapéuticos directos (p.ej., en un enfoque de terapia génica).

[0077] En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos en cuestión que codifican polipéptidos de ActRIIb incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 4 o 5. Las secuencias nucleotídicas variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones nucleotídicas, tales como variantes alélicas.

[0078] En ciertos supuestos, la divulgación proporciona secuencias de ácido nucleico aislado o recombinante que son al menos un 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 4, 5 o 18. Un especialista en la materia apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias de las SEQ ID NO: 4, 5 o 18 y variantes de las SEQ ID NO: 4, 5 o 18 están también dentro del alcance de esta divulgación. En supuestos adicionales, las secuencias de ácido nucleico de la divulgación pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia nucleotídica heteróloga, o estar en una colección de ADN.

[0079] En otros supuestos, los ácidos nucleicos de la divulgación incluyen también secuencias nucleotídicas, y los polipéptidos de ActRIIb codificados por dichos ácidos nucleicos que hibridan en condiciones altamente rigurosas con la secuencia nucleotídica designada en las SEQ ID NO: 4, 5 o 18, la secuencia complementaria de las SEQ ID NO: 4, 5 o 18, o fragmentos de cualquiera de las anteriores. Como se discute anteriormente, un especialista en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigor apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Un especialista en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigor apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Por ejemplo, podría efectuarse la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45 °C, seguido de lavado con 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse desde un bajo rigor de alrededor de 2,0 x SSC a 50 °C a un alto rigor de alrededor de 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde las condiciones de bajo rigor a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, a las condiciones de alto rigor a alrededor de 65 °C. Pueden variar tanto la temperatura como la sal o la temperatura o concentración salina pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una ocasión, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de bajo rigor de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de lavado con 2 x SSC a temperatura ambiente.

[0080] Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se exponen en las SEQ ID NO: 4, 5 o 18 debido a la degeneración del código genético están también dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, una serie de aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia aminoacídica de la proteína. Sin embargo, se espera que existan entre las células de mamífero polimorfismos de secuencia de ADN que conduzcan a cambios en las secuencias aminoacídicas de las proteínas en cuestión. Un especialista en la materia apreciará que pueden existir

estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta alrededor de un 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular entre los individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Todas y cada una de dichas variaciones nucleotídicas y los polimorfismos aminoacídicos resultantes están dentro del alcance de esta divulgación.

5

[0081] En ciertos supuestos, los ácidos nucleicos recombinantes de la divulgación puede estar ligados operativamente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias nucleotídicas reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula hospedadora usada para expresión. Son conocidos en la materia numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células hospedadoras. Típicamente, dichas una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión a ribosoma, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación traduccional y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles conocidos en la materia están contemplados por la divulgación. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión puede insertarse en un cromosoma. En una ocasión preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la materia y variarán con la célula hospedadora usada.

20

[0082] En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona el ácido nucleico en cuestión en un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de ActRIIb y ligada operativamente con al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la materia y se seleccionan para la expresión directa del polipéptido de ActRIIb. Por consiguiente, el término secuencias reguladoras incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras ejemplares en Goeddel; "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está ligada operativamente con ella en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ActRIIb. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, las regiones operativa y promotora principales del fago lambda, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, p.ej. Pho5, los promotores de factores de apareamiento α de levadura, el promotor poliédrico del sistema baculovírico y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de célula procarióticas o eucarióticas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debería entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora para transformar y/o del tipo de proteína que se desee expresar. Además, debería considerarse también el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores antibióticos.

35

[0083] Puede producirse un ácido nucleico recombinante de la divulgación ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para expresión en células procarióticas, células eucarióticas (de levadura, ave, insecto o mamífero) o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de 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 expresión en células procarióticas tales como E. coli.

45

[0084] Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucariótica que se expresan en células eucarióticas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, 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 eucarióticas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y selección por resistencia a fármacos tanto en células procarióticas como eucarióticas. Como alternativa, pueden usarse derivados de virus tales como papilomavirus bovino (BPV-1) o virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Pueden encontrarse ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluyendo retrovíricos) a continuación en la descripción de sistemas de suministro de terapia génica. Los diversos

50

55

procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son bien conocidos en la materia. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procarióticas como eucarióticas, así como procedimientos recombinantes generales, véase "Molecular Cloning A Laboratory Manual", 3ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión baculovírico. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión baculovíricos incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene β -gal).

10 **[0085]** En una ocasión preferida, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCneo (Promega, Madison, Wisc.). Como resultará evidente, pueden usarse los constructos génicos en cuestión para causar la expresión de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión en células propagadas en cultivo, p.ej., para producir proteínas incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para
15 purificación.

[0086] Esta divulgación atañe también a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (p.ej., las SEQ ID NO: 4, 5 o 18) para uno o más de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, puede expresarse un polipéptido de ActRIIb de la invención en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (p.ej., usando un sistema de expresión baculovírico), levadura o células de mamífero. Son conocidas por los especialistas en la materia otras células hospedadoras adecuadas.

[0087] Por consiguiente, la presente divulgación atañe además a procedimientos de producción de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión. Por ejemplo, puede cultivarse una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRIIb en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido de ActRIIb. El polipéptido de ActRIIb puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de ActRIIb. Como alternativa, el polipéptido de ActRIIb puede retenerse citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y recolectarse las células, lisarse y aislarse la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para cultivo celular son bien conocidos en la materia. Los polipéptidos de ActRIIb en cuestión pueden aislarse del medio de cultivo celular, células hospedadoras o ambos usando técnicas conocidas en la materia para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoadfinidad con anticuerpos específicos de epítomos particulares de polipéptidos de ActRIIb y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido de ActRIIb (p.ej., puede usarse una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIb-Fc). En una realización preferida, el polipéptido de ActRIIb de la invención es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una ocasión preferida, se consigue la purificación 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 de Q-Sepharose, cromatografía de fenil-Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración vírica e intercambio de tampón. Opcionalmente, un esquema de purificación implica lo siguiente: una columna de proteína A MabSelect™ (GE Healthcare) con proteína en una solución salina tamponada con Tris (pH 8,0) (TBS), lavada con TBS (NaCl 150 mM, pH 8,0) y TBS (NaCl 50 mM, pH 8,0) y eluida con glicina 0,1 mM a pH 3,0; el eluido puede pasarse por una columna de Q-Sepharose en TBS a pH 8,0 y eluirse con TBS que contiene cualquiera de NaCl 200-250, 210-250, 220-250, 210-230, 215-225 o 225-235 mM; el eluido puede cambiarse a NH_4SO_4 1,1 M, Tris 50 mM, pH 8,0, lavarse con el mismo tampón y eluirse con solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 o 7,4 a cualquiera de NH_4SO_4 200-250, 210-250, 220-250, 210-230, 215-225 o 225-235 mM. El material eluido puede dializarse, someterse a filtración vírica y usarse para la formulación final.

50 **[0088]** En otra ocasión, 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 de ActRIIb recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina de metal de Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación puede retirarse posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa, proporcionando el polipéptido de ActRIIb purificado (p.ej., véase Hochuli y col., (1987) J. Chromatography 411: 177 y Janknecht y col., PNAS USA 88: 8972).

[0089] Las técnicas para elaborar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, se efectúa la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas de acuerdo con técnicas

convencionales, empleando extremos romos o extremos escalonados para ligamiento, digestión con enzima de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de los extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligamiento enzimático. En otra ocasión, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automáticos.

5 Como alternativa, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos, que pueden reasociarse posteriormente generando una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

10 4. Antagonistas de ActRIIb de activina alternativos

[0090] Aunque los polipéptidos de ActRIIb solubles, y particularmente las fusiones ActRIIb-Fc, son antagonistas preferidos, se espera que otros tipos de antagonistas de ActRIIb sean útiles, incluyendo anticuerpos anti-ActRIIb, ácidos nucleicos anticodificantes, iARN o ribozimas que inhiban la producción de ActRIIb, y otros

15 inhibidores de ActRIIb, particularmente aquellos que desestabilizan la unión a ActRIIb.

[0091] Puede usarse un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido de ActRIIb (p.ej., un polipéptido de ActRIIb soluble) y que se une competitivamente a ligando con el polipéptido de ActRIIb, o inhibe de otro modo la señalización mediada por ActRIIb, como antagonista de actividades del polipéptido de ActRIIb.

20 **[0092]** Al usar inmunógenos derivados del polipéptido de ActRIIb, pueden elaborarse antisueros antiproteína/antipéptido o anticuerpos monoclonales mediante protocolos estándares (véase, por ejemplo, "Antibodies: A Laboratory Manual" ed. por Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido de ActRIIb,

25 un fragmento antigénico que es capaz de desencadenar una respuesta de anticuerpo o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación con portadores u otras técnicas bien conocidas en la materia. Puede administrarse una porción inmunogénica de un polipéptido de ActRIIb en presencia de un coadyuvante. La progresión de la inmunización puede monitorizarse mediante la detección de los títulos de anticuerpo en plasma o suero. Pueden usarse ELISA estándar u otros inmunoensayos con el

30 inmunógeno como antígeno para valorar los niveles de anticuerpos.

[0093] Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de polipéptido de ActRIIb, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recolectarse células productoras de anticuerpo (linfocitos) de un animal

35 inmunizado y fusionarse mediante procedimientos de fusión de células somáticas estándares con células inmortalizadas tales como células de mieloma, procurando células de hibridoma de levadura. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbar y col., (1983) *Immunology Today*, 4: 72) y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole

40 y col., (1985) "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. pág. 77-96). Puede cribarse inmunológicamente en las células de hibridoma la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de ActRIIb y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

45 **[0094]** El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria pretende incluir anticuerpos completos, p.ej. de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos o dominios de inmunoglobulinas que son reactivos con un antígeno seleccionado. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y cribarse en los fragmentos la utilidad y/o interacción con un epítipo específico de interés. Por tanto, el término incluye segmentos de porciones escindidas proteolíticamente o preparadas recombinantemente de una molécula de

50 anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una cierta proteína. Los ejemplos no limitantes de dichos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, y anticuerpos monocatenarios (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un ligador peptídico. Los scFv pueden estar ligados covalente o no covalentemente, formando anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión. El término anticuerpo incluye también preparaciones policlonales, monoclonales u otras purificadas de anticuerpos y anticuerpos

55 recombinantes. El término "anticuerpo recombinante" significa un anticuerpo, o dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina, expresado por un ácido nucleico que se ha construido usando las técnicas de biología molecular, tal como un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano desarrollado a partir de un anticuerpo monocatenario. Los anticuerpos de un solo dominio y monocatenarios están también incluidos dentro del término "anticuerpo recombinante".

[0095] En ciertos supuestos, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo monoclonal y, en ciertos supuestos, la divulgación pone a disposición procedimientos para generar anticuerpos novedosos. Por ejemplo, un procedimiento para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de ActRIIb puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipeptídico antigénico eficaz para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obtener células productoras de anticuerpo (p.ej., células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpo con células de mieloma, obteniendo hibridomas productores de anticuerpo, y ensayar los hibridomas productores de anticuerpo para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, puede propagarse un hibridoma en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo en que las células derivadas de hibridoma produzcan el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse del cultivo celular.

[0096] El adjetivo “específicamente reactivo con” como se usa con referencia a un anticuerpo pretende significar, como se entiende generalmente en la materia, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (p.ej., un polipéptido de ActRIIb) y otros antígenos que no son de interés, siendo el anticuerpo útil, como mínimo, para detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos procedimientos 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 eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción de anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque puede alcanzarse la especificidad deseada con un intervalo de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de alrededor de 10-6, 10-7, 10-8, 10-9 M o menos.

[0097] Además, las técnicas usadas para cribar anticuerpos para identificar un anticuerpo deseable pueden estar influidas por las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unión a un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión en solución. Están disponibles una variedad de diferentes técnicas para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmón de superficie (p.ej., el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de sándwich (p.ej., el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

[0098] Los ejemplos de categorías de compuestos de ácido nucleico que son antagonistas de ActRIIb incluyen ácidos nucleicos anticodificantes, constructos de ARNi y constructos de ácido nucleico catalíticos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser mono- o bicatenario. Un compuesto bicatenario puede incluir también regiones de superposición o no complementariedad, donde una u otra de las hebras es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, lo que significa que el compuesto forma la denominada estructura de “horquilla” o “tallo-bucle”, con una región de estructura helicoidal doble. Un compuesto de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que es complementaria de una región consistente en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 25, 22, 20, 18 o 15 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de ActRIIb completo o secuencia de ácido nucleico de activina β A, β B, β C o β E. La región de complementariedad será preferiblemente de al menos 8 nucleótidos, y opcionalmente de alrededor de 18 a 35 nucleótidos. La región de complementariedad puede caer dentro de un intrón, una secuencia de codificación o una secuencia de no codificación del transcrito diana, tal como la porción de la secuencia de codificación. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de alrededor de 8 a alrededor de 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y opcionalmente la longitud será de alrededor de 14 a alrededor de 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para uso como anticodificante), ARN o híbrido de ARN:ADN. Cualquier hebra puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ARN o ADN. Igualmente, un compuesto bicatenario puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN, y cualquier hebra puede incluir también una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, incluyendo una o más modificaciones en el esqueleto (la porción de azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo ligamientos internucleotídicos) o la porción de base (la porción de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico anticodificante tendrá preferiblemente una longitud de alrededor de 15 a alrededor de 30 nucleótidos y contendrá a menudo una o más modificaciones para mejorar características tales como estabilidad en suero, en una célula o en un lugar donde el compuesto es probable que se suministre, tal como el estómago en el caso de compuestos suministrados por vía oral y el pulmón para

compuestos inhalados. En el caso de un constructo de iARN, la hebra complementaria del transcrito diana será generalmente ARN o modificaciones del mismo. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción de dúplex del constructo de iARN bicatenario o monocatenario de "horquilla" tendrá generalmente una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente alrededor de 21 a 23 nucleótidos de longitud, siempre que sirva para como sustrato de Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y pueden contener también formas modificadas. Los compuestos de ácido nucleico pueden inhibir la expresión de la diana en alrededor de un 50, 75, 90 % o más cuando se ponen en contacto con células en condiciones fisiológicas y a una concentración en que un control no codificante o codificante tenga poco o ningún efecto. Las concentraciones preferidas para ensayar el efecto de los compuestos de ácido nucleico son 1,5 y 10 micromolar. En los compuestos de ácido nucleico pueden ensayarse también los efectos sobre, por ejemplo, los niveles de glóbulos rojos.

[0099] En ciertos supuestos, el antagonista de ActRIIb puede ser un polipéptido de folistatina que antagoniza la bioactividad de activina y/o se une a activina. El término "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de folistatina de origen natural así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retenga una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcional de folistatina. Las variantes de polipéptidos de folistatina que retienen actividades de unión a activina pueden identificarse basándose en estudios previos que implican interacciones de folistatina y activina. Por ejemplo, el documento WO2008/030367 divulga dominios de folistatina específicos ("FSD") que se muestra que son importantes para la unión a activina. Como se muestra a continuación en las SEQ ID NO: 9-11, el dominio de folistatina N-terminal ("FSND" SEQ ID NO: 9), FSD2 (SEQ ID NO: 10) y, en menor medida FSD1 (SEQ ID NO: 11), representan dominios ejemplares dentro de la folistatina importantes para la unión a activina. Además, se describen anteriormente procedimientos para la elaboración y ensayo de colecciones de polipéptidos en el contexto de polipéptidos de ActRIIb, y dichos procedimientos atañen también a la elaboración y ensayo de variantes de folistatina. Los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tengan una secuencia al menos alrededor de un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina, y opcionalmente al menos un 85, 90, 95, 97, 99 % o más identidad. Los ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de folistatina humana (SEQ ID NO: 7) como se describe, por ejemplo, en el documento WO2005/025601.

[0100] La isoforma FST344 del polipéptido precursor de folistatina humana es como sigue:

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
 SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFLKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDC
 GPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARC
 KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
 SSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
 TGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
 ACSSGVLLLEVKGHCNS**ISEDTEEEEDQDYSFPISILEW** (SEQ ID
 NO: 7; NP_037541.1 **ISOFORMA FST344 de FOLISTATINA**)

[0101] El péptido señal está subrayado, los últimos 27 residuos en negrita representan aminoácidos adicionales en comparación con la isoforma de folistatina más corta FST317 (NP_006341) siguiente.

[0102] La isoforma polipeptídica precursora de folistatina humana FST317 es como sigue:

MVRARHQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
 SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDC
 GPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARC
 KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
 SSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
 TGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
 ACSSGVLLEVKHSGSCN (SEQ ID NO: 8)

[0103] El péptido señal está subrayado.

5 [0104] La secuencia de dominio de folistatina N-terminal (FSND) es como sigue:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWM
 IFNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 9; FSND)

[0105] Las secuencias FSD1 y FSD2 son como sigue: ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 10; FSD1) KTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVT (SEQ ID NO: 11; FSD2).

[0106] En otros supuestos, el antagonista para uso en la presente memoria puede ser un gen relacionado de tipo folistatina (FLRG) que antagoniza la bioactividad de activina y/o se une a activina y otros ligandos con un espectro parecido al del ActRIIb-Fc. El término "polipéptido de FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de FLRG de origen natural así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retenga una actividad útil. Las variantes de polipéptidos de FLRG que retienen actividad de unión a activina pueden identificarse usando procedimientos rutinarios para ensayar las interacciones de FLRG y activina. Véase, por ejemplo, el documento US 6.537.966. Además, se describen anteriormente procedimientos para elaborar y ensayar colecciones de polipéptidos en el contexto de polipéptidos de ActRIIb, y dichos procedimientos atañen también a la elaboración y ensayo de variantes de FLRG. Los polipéptidos de FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocido que tengan una secuencia al menos alrededor de un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de FLRG, y opcionalmente al menos un 85, 90, 95, 97, 99 % o más identidad.

25 [0107] El polipéptido precursor de FLRG humano es como sigue:

MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGVSSMSGNPAPGGVCWLQQGQEATCSL
 VLQTDVTRAECASGNIDTAWSNLTHPGNKINLLGFLGLVHCLPCKDSCD
 GVECGPGKACRMLGGRPRCECAPDCSGLPARLQVCGSDGATYRDECELRA
 ARCRGHPDLSVMYRGRCRKSCHEVVCPRPQSCVVDQTGSAHCVCVRAAPC
 VPSSPGQELCGNNNVITYISSCHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPEEPP
 GGESAEEEENFV (SEQ ID NO: 12; NP_005851)

[0108] El péptido señal está subrayado.

30 [0109] En cierto supuestos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG incluyen una proteína de fusión que tiene al menos una porción de los polipéptidos de folistatina o polipéptidos de FLRG y uno o más dominios de fusión tales como, por ejemplo, dominios que faciliten el

aislamiento, detección, estabilización o multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se discuten con detalle anteriormente con referencia a los polipéptidos de ActRIIb. En una ocasión, es un antagonista una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de follistatina fusionado con un dominio Fc. En otra ocasión, es un antagonista una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de FLRG fusionado con un dominio Fc. Se ha mostrado en la bibliografía que follistatina y FLRG, y por los solicitantes con respecto a FLRG, tienen afinidades por activina A en el intervalo picomolar, indicando que estos agentes inhibirán la señalización de activina A en un grado similar a ActRIIb-Fc.

5. Ensayos de cribado

[0110] En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere al uso de polipéptidos de ActRIIb (p.ej., polipéptidos de ActRIIb solubles) y activina u otros ligandos de ActRIIb para identificar compuestos (agentes) que sean agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de ActRIIb. Los compuestos identificados mediante este cribado pueden ensayarse para valor su capacidad de modular el crecimiento o mineralización óseo o estimular el crecimiento muscular *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos pueden ensayarse además en modelos animales para valorar su capacidad de modular el crecimiento de tejido *in vivo*.

[0111] Existen numerosos enfoques para cribar en agentes terapéuticos la modulación del crecimiento de tejido mediante orientación de polipéptidos de ActRIIb. En ciertos supuestos, puede llevarse a cabo un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar los agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIb sobre hueso o músculo. En ciertos supuestos, se lleva a cabo el ensayo para cribar e identificar compuestos que inhiban específicamente o reduzcan la unión de un polipéptido de ActRIIb a activina u otro ligando. Como alternativa, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que potencien la unión de un polipéptido de ActRIIb a activina u otro ligando. En una ocasión adicional, los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido de ActRIIb.

[0112] Será suficiente una variedad de formatos de ensayo y, a la vista de la presente divulgación, aquellos no descritos expresamente en la presente memoria estarán no obstante comprendidos por un especialista en la materia. Como se describe en la presente memoria, los compuestos de prueba (agentes) de la divulgación pueden crearse mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. Como alternativa, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) para ensayar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento de tejido pueden producirse, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (p.ej., productos naturales), producirse químicamente (p.ej., moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos) o producirse recombinantemente. Los compuestos de prueba contemplados por la presente divulgación incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En una ocasión específica, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de alrededor de 2.000 Da.

[0113] Los compuestos de prueba de la divulgación pueden proporcionarse como entidades simples discretas o proporcionarse en colecciones de mayor complejidad, tales como elaboradas por química combinatoria. Estas colecciones pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de cribado inicial. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y tienen 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.

[0114] En muchos programas de cribado de fármacos que ensayan colecciones de compuestos y extractos naturales, son deseables los ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos examinados en un periodo dado de tiempo. Los ensayos que se efectúan en sistemas exentos de células, tales como derivados con proteínas purificadas o semipurificadas, se prefieren a menudo como cribados "primarios" porque pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente sencilla de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad o biodisponibilidad celular del compuesto de prueba pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, estando centrado el ensayo en cambio principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular, como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido de ActRIIb y activina.

[0115] Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado ejemplar de la presente divulgación, el compuesto

de interés se pone en contacto con un polipéptido de ActRIIb aislado y purificado que es habitualmente capaz de unirse a activina. Se añade entonces a la mezcla de compuesto y polipéptido de ActRIIb una composición que contiene un ligando de ActRIIb. La detección y cuantificación de complejos de ActRIIb/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejo entre el polipéptido de ActRIIb y la activina. La eficacia del compuesto puede valorarse generando curvas de dosis y respuesta a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, puede efectuarse también un ensayo de control para proporcionar un valor basal para comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido de ActRIIb y se cuantifica la formación del complejo ActRIIb/activina en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, puede variar el orden en que pueden mezclarse los reactivos, y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden usarse extractos celulares y lisados para volver un sistema de ensayo exento de células adecuado.

[0116] La formación de complejo entre el polipéptido de ActRIIb y la activina puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas marcadas detectablemente tales como polipéptido de ActRIIb o activina radiomarcado (p.ej., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcado fluorescentemente (p.ej., FITC) o marcado enzimáticamente, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

[0117] En ciertos supuestos, la presente divulgación contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) en la medida, directa o indirecta, del grado de interacción entre un polipéptido de ActRIIb y su proteína de unión. Además, son compatibles otros modos de detección, tales como aquellos basados en guías de onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y patente de EE.UU. n° 5.677.196), resonancia de plasmón de superficie (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, con muchos supuestos de la divulgación.

[0118] 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 desestabilizan o potencian la interacción entre un polipéptido de ActRIIb y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.283.317; Zervos y col. (1993) *Cell* 72: 223-232; Madura y col. (1993) *J Biol Chem* 268: 12046-12054; Bartel y col. (1993) *Biotechniques* 14: 920-924 e Iwabuchi y col. (1993) *Oncogene* 8: 1693-1696). En un supuesto específico, la presente divulgación contempla el uso de sistemas inversos de dos híbridos para identificar compuestos (p.ej., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido de ActRIIb y su proteína de unión. Véanse, 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° 5.525.490, 5.955.280 y 5.965.368.

[0119] En ciertos supuestos, los compuestos en cuestión se identifican por su capacidad de interactuar con un polipéptido de ActRIIb o activina de la divulgación. La interacción entre el compuesto y el polipéptido de ActRIIb o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse a nivel de proteína usando procedimientos bioquímicos *in vitro*, incluyendo fotorreticulación, unión a ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB y col., 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden cribarse en un ensayo basado en el mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de activina o ActRIIb. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o fase fluida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido de activina o ActRIIb puede transfectarse con un sistema informador (p.ej., β -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y cribarse frente a la colección preferiblemente mediante un cribado de alto rendimiento o con los miembros individuales de la colección. Pueden usarse otros ensayos de unión basados en el mecanismo, por ejemplo ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden efectuarse con la diana fijada a una pared, perla o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse habitualmente usando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmón de superficie.

[0120] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona procedimientos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación ósea y aumentar la masa ósea. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede ensayarse en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento de hueso o cartílago. Pueden utilizarse con este fin diversos procedimientos conocidos en la materia.

[0121] Por ejemplo, puede determinarse el efecto de los polipéptidos de ActRIIb o activina o los compuestos de prueba sobre el crecimiento de hueso o cartílago midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos basados en células (véanse, p.ej., Daluiski y col., *Nat Genet.* 2001,

27(1): 84-8; Hino y col., *Front Biosci.* 2004, 9: 1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye el análisis de la actividad osteogénica de los polipéptidos de ActRIIb o activina y compuestos de ensayo en cuestión en células progenitoras mesenquimáticas y osteoblásticas. Para ilustrar, pueden construirse adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido de activina o ActRIIb para infectar células C3H10T1/2 progenitoras mesenquimáticas pluripotentes, células C2C12 preosteoblásticas y células TE-85 osteoblásticas. Se determina entonces la actividad osteogénica midiendo la inducción de fosfatasa alcalina, osteocalcina y mineralización de matriz (véase, p.ej., Cheng y col., *J Bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8): 1544-52).

[0122] La presente divulgación contempla también ensayos *in vivo* para medir el crecimiento de hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai y col., *Bone*, 28: 80-86 (2001) divulga un modelo de rata osteoporótica en que se estudia la reparación ósea durante el periodo temprano después de fractura. Kubo y col., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68: 197-202 (1999) divulga también un modelo de rata osteoporótica en que se estudia la reparación ósea durante el periodo tardío después de fractura. Andersson y col., *J. Endocrinol.* 170: 529-537 describen un modelo de osteoporosis en ratón en que se someten los ratones a ovariectomía, lo que causa que los ratones pierdan un contenido mineral óseo y densidad mineral ósea sustanciales, perdiendo el hueso trabecular cerca de un 50 % de densidad mineral ósea. La densidad ósea podía aumentarse en los ratones sometidos a ovariectomía mediante la administración de factores tales como hormona paratiroidea. En ciertos aspectos, la presente divulgación hace uso de ensayos de curación de fractura que son conocidos en la materia. Estos ensayos incluyen la técnica de fractura, análisis histológico y análisis biomecánicos que se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.521.750.

[0123] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona procedimientos y agentes para estimular el crecimiento muscular y aumentar la masa muscular, por ejemplo, antagonizando funciones de un polipéptido y/o de un ligando de ActRIIb. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede ensayarse en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento muscular. Pueden utilizarse con este fin diversos procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, se efectúan procedimientos de la divulgación de tal modo que la transducción de señal a través de una proteína ActRIIb activada por unión a un ligando de ActRIIb (p.ej., GDF8) se haya reducido o inhibido. Se reconocerá que el crecimiento de tejido muscular en el organismo daría como resultado una masa muscular aumentada en el organismo en comparación con la masa muscular del correspondiente organismo (o población de organismos) en que no se hubiera efectuado la transducción de señal a través de una proteína ActRIIb.

[0124] Por ejemplo, puede determinarse el efecto de los polipéptidos de ActRIIb o compuestos de prueba sobre el crecimiento/proliferación de células musculares midiendo la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, que están asociados a la proliferación de células miogénicas, y la expresión génica de MyoD, que está asociado a la diferenciación muscular (p.ej., Amthor y col., *Dev Biol.* 2002, 251: 241-57). Es conocido 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 de ActRIIb o compuestos de prueba 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 polipéptidos de ActRIIb o compuestos de prueba (p.ej., Thomas y col., *J Biol Chem.* 2000, 275: 40235-43).

[0125] La presente divulgación contempla también ensayos *in vivo* para medir la masa y fuerza musculares. Por ejemplo, Whittemore y col. (*Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 300: 965-71) divulga un procedimiento de medida de la masa muscular esquelética aumentada y de la fuerza de agarre aumentada en ratones. Opcionalmente, este procedimiento puede usarse para determinar los efectos terapéuticos de los compuestos de prueba (p.ej., polipéptidos de ActRIIb) sobre enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo aquellas enfermedades para las que la masa muscular es limitante.

[0126] Se entiende que los ensayos de cribado de la presente divulgación se aplican no solo a los polipéptidos de ActRIIb en cuestión y variantes de los polipéptidos de ActRIIb, sino también a cualquier compuesto de prueba incluyendo agonistas y antagonistas de polipéptidos de ActRIIb. Además, estos ensayos de cribado son útiles para la verificación de fármacos diana y con fines de control de calidad.

6. Usos terapéuticos ejemplares

[0127] Los polipéptidos de ActRIIb de la presente invención pueden usarse para estimular el crecimiento óseo anabólico, tratar un tumor óseo osteolítico y/o tratar o prevenir una enfermedad o afección que se beneficiaría de crecimiento muscular. En ciertas realizaciones, pueden usarse antagonistas de ActRIIb de la invención para tratar o prevenir la pérdida ósea relacionada con cáncer. En ciertos supuestos, la presente divulgación proporciona

procedimientos de tratamiento o prevención del daño óseo en un individuo necesitado de ello mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de ActRIIb, particularmente un polipéptido de ActRIIb. En ciertos supuestos, la presente divulgación proporciona procedimientos de promoción del crecimiento o mineralización óseos en un individuo necesitado de ello mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de ActRIIb, particularmente un polipéptido de ActRIIb. Estos procedimientos están preferiblemente dirigidos a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más preferiblemente seres humanos. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona el uso de antagonistas de ActRIIb de la invención, particularmente polipéptidos de ActRIIb solubles, para el tratamiento de trastornos asociados a una baja densidad ósea o una resistencia ósea disminuida.

[0128] Como se usa en la presente memoria, un producto terapéutico que “previene” un trastorno o afección hace referencia a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada respecto a una muestra de control no tratada, o retarda el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección respecto a la muestra de control no tratada. El término “tratar” como se usa en la presente memoria incluye la profilaxis de la afección citada o la mejora o eliminación de la afección una vez se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento pueden distinguirse en el diagnóstico proporcionado por un médico y el resultado pretendido de administración del agente terapéutico.

[0129] La divulgación proporciona procedimientos de inducción de la formación de hueso y/o cartílago, la prevención de pérdida ósea, el aumento de mineralización ósea o la prevención de la desmineralización de hueso. Por ejemplo, los antagonistas de ActRIIb en cuestión tienen aplicación en el tratamiento de osteoporosis y la curación de fracturas óseas y defectos de cartílago en seres humanos y otros animales. Los polipéptidos de ActRIIb pueden ser útiles en pacientes que se diagnostican con densidad ósea baja subclínica, como medida protectora frente al desarrollo de osteoporosis.

[0130] En una realización específica, las composiciones de la presente invención pueden encontrar utilidad médica en la curación de fracturas óseas y defectos de cartílago en seres humanos y otros animales. Las composiciones en cuestión pueden tener también uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas así como abiertas y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de hueso *de novo* inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo o inducidos por resección oncológica, y es también útil en cirugía plástica cosmética. En ciertos casos, los antagonistas de ActRIIb en cuestión pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Los antagonistas de ActRIIb de la invención pueden ser también útiles en el tratamiento de osteoporosis.

[0131] Las composiciones de la invención pueden aplicarse a afecciones caracterizadas por o que causan pérdida ósea, tales como osteoporosis (incluyendo osteoporosis secundaria), hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, enfermedad de Paget, tirotoxicosis, estado de diarrea crónica o malabsorción, enfermedad renal crónica, acidosis tubular renal o anorexia nerviosa.

[0132] La osteoporosis puede estar causada por, o asociada con, diversos factores. Ser mujer, particularmente una mujer postmenopáusica, tener un bajo peso corporal y llevar un estilo de vida sedentario son todos factores de riesgo para osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea que conduce a riesgo de fractura). Las personas que tienen algunos de los perfiles siguientes pueden ser candidatas al tratamiento con un antagonista de ActRIIb: una mujer postmenopáusica y que no toma terapia de reemplazo de estrógenos u otra hormona; una persona con un historial personal o materno de fractura de cadera o tabaquismo; una mujer postmenopáusica que es alta (más de 1,70 m) o delgada (menos de 56,7 kg); un hombre con afecciones clínicas asociadas a la pérdida ósea; una persona que use medicaciones que son conocidas por causar pérdida ósea, incluyendo corticosteroides tales como Prednisone™, diversas medicaciones anticonvulsivas tales como Dilantin™ y ciertos barbituratos, o fármacos de reemplazo de tiroides de alta dosis; una persona con enfermedad hepática o un historial familiar de osteoporosis; una persona que tiene un alto recambio óseo (p.ej., colágeno excesivo en muestras de orina) o una persona con una afección tiroidea, tal como hipertiroidismo; una persona que ha experimentado una fractura después de un traumatismo solo moderado o una persona que tiene evidencias por rayos X de fractura vertebral u otros signos e osteoporosis.

[0133] Como se señala anteriormente, la osteoporosis puede ser también el resultado de una afección asociada a otro trastorno o por el uso de ciertas medicaciones. La osteoporosis resultante de fármacos u otra afección médica es conocida como osteoporosis secundaria. En una afección conocida como enfermedad de

Cushing, la cantidad en exceso de cortisol producido por el cuerpo da como resultado osteoporosis y fracturas. Las medicaciones más comunes asociadas a la osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque son necesarios niveles adecuados de hormonas tiroideas (que se producen por la glándula tiroidea) para el desarrollo del esqueleto, la hormona tiroidea en exceso puede disminuir la masa ósea con el tiempo. Otras medicaciones que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fentoína (Dilantin) y barbituratos, que se usan para prevenir convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un fármaco para algunas formas de artritis, cáncer y enfermedades inmunitarias; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un fármaco usado para tratar algunas enfermedades autoinmunitarias y para suprimir el sistema inmunitario en pacientes de trasplante de órgano; agonistas de hormona liberadora de hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), usados para tratar cáncer de próstata y endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), una medicación anticoagulante y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), usados para tratar el colesterol alto.

[0134] La pérdida ósea resultante de terapia del cáncer está ampliamente reconocida y se denomina pérdida ósea inducida por terapia del cáncer (CTIBL). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden corregirse por tratamiento con antagonistas de ActRIIb.

[0135] En una realización preferida, los antagonistas de ActRIIb de la invención, particularmente un ActRIIb soluble, divulgados en la presente memoria pueden usarse en pacientes de cáncer. Como se demuestra en la presente memoria, una proteína de fusión ActRIIb-Fc es capaz de promover el crecimiento óseo anabólico en pacientes humanos. Se ha demostrado que los agentes óseos anabólicos son útiles para tratar mieloma múltiple (véanse, p.ej., Yaccoby y col., *Blood*, 109(5): 2106-11 (2007); Oyajobi y col., *Br J Haematol.* 139(3): 434-8 (2007); Fulciniti y col., *Blood*, 114(2): 371-9 (2009); Stewart y col. *Journal of Cellular Biochemistry* 98: 1-13 (2006)). Por consiguiente, se cree que los antagonistas de activina-ActRIIb descritos en la presente memoria son útiles para tratar mieloma múltiple y otros tumores óseos. Los pacientes que tienen ciertos tumores (p.ej. de próstata, mama, mieloma múltiple o cualquier tumor causante de hiperparatiroidismo) son de alto riesgo para pérdida ósea debido a la pérdida ósea inducida por el tumor, así como las metástasis óseas y agentes terapéuticos. Dichos pacientes pueden tratarse con antagonistas de ActRIIb incluso en ausencia de evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas. Puede monitorizarse también en los pacientes la evidencia de pérdida ósea o metástasis ósea, y pueden tratarse con antagonistas de ActRIIb en el caso de indicadores que sugieran un riesgo aumentado. Generalmente, se emplean barridos de DEXA para valorar los cambios en la densidad ósea, mientras que pueden usarse indicadores de remodelación ósea para valorar la probabilidad de metástasis óseas. Pueden monitorizarse marcadores séricos. La fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP) es una enzima que está presente en osteoblastos. Los niveles sanguíneos de BSAP están aumentados en pacientes con metástasis ósea y otras afecciones que dan como resultado una remodelación ósea aumentada. La osteocalcina y péptidos de procolágeno están también asociados a la formación de hueso y las metástasis óseas. Se han detectado aumentos de BSAP en pacientes con metástasis ósea causada por cáncer de próstata y, en menor grado, en metástasis óseas de cáncer de mama. Los niveles de proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7) son altos en cáncer de próstata que ha metastatizado al hueso, pero no en metástasis óseas debidas a cáncer de vejiga, piel, hígado o pulmón. El telopéptido carboxiterminal de tipo I (ICTP) es una reticulación encontrada en colágeno que se forma durante la resorción de hueso. Puesto que el hueso se rompe y se reforma constantemente, se encontrará ICTP por todo el cuerpo. Sin embargo en el sitio de metástasis ósea, el nivel será significativamente mayor que en la zona de hueso normal. El ICTP se ha encontrado a altos niveles en metástasis ósea debida a cáncer de próstata, pulmón y mama. Se produce otra reticulación de colágeno, el telopéptido N-terminal de tipo I (NTx) junto con ICTP durante el recambio óseo. La cantidad de NTx aumenta en metástasis ósea causada por muchos tipos diferente de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, próstata y mama. También, los niveles de NTx aumentan con la progresión de la metástasis ósea. Por lo tanto, este marcador puede usarse tanto para detectar metástasis como para medir la extensión de la enfermedad. Otros marcadores de resorción incluyen piridinolina y desoxipiridinolina. Cualquier aumento de los marcadores de resorción o marcadores de metástasis óseas indica la necesidad de terapia antagonista de ActRIIb en un paciente.

[0136] Debido a que la ActRIIb-Fc tiene un claro efecto sobre los marcadores de actividad osteoblástica (p.ej., los niveles de BSAP), las moléculas de ActRIIb-Fc pueden ser particularmente útiles en situaciones de pérdida ósea relacionada con cáncer donde la enfermedad ósea es de naturaleza osteolítica, en lugar de naturaleza osteoblástica. Esto es típicamente cierto para mieloma múltiple y metástasis óseas de una variedad de tumores. Sin embargo, las metástasis óseas de cáncer de próstata en particular tienen tendencia a ser de naturaleza osteoblástica y las proteínas de fusión ActRIIb-Fc pueden no ser beneficiosas en esta situación.

[0137] Los antagonistas de ActRIIb pueden administrarse conjuntamente con otros agentes farmacéuticos. La administración conjunta puede lograrse mediante la administración de una única coformulación, mediante la

administración simultánea o mediante la administración en momentos separados. Los antagonistas de ActRIIb pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros agentes activos en hueso. Un paciente puede beneficiarse de recibir conjuntamente antagonista de ActRIIb y tomar suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio apropiado y/o, en algunos casos, otra medicación. Los ejemplos de otras medicaciones incluyen bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógeno y raloxifeno afectan al ciclo de remodelación ósea y se clasifican como medicaciones antirresortivas. La remodelación ósea consiste en dos etapas distintas: resorción ósea y formación ósea. Las medicaciones antirresortivas retardan o detienen la porción de resorción ósea del ciclo de remodelación ósea, pero no retardan la porción de formación ósea del ciclo. Como resultado, la nueva formación continúa a una mayor tasa que la resorción ósea, y la densidad ósea puede aumentar con el tiempo. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, aumenta la tasa de formación ósea en el ciclo de remodelación ósea. El alendronato está aprobado tanto para la prevención (5 mg al día o 35 mg una vez por semana) como el tratamiento (10 mg al día o 70 mg una vez por semana) de osteoporosis postmenopáusica. El alendronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna, muñeca y cadera. El alendronato está también aprobado para el tratamiento de osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres como resultado del uso a largo plazo de estas medicaciones (concretamente, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de osteoporosis en hombres. El alendronato más vitamina D está aprobado para el tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (70 mg una vez por semana más vitamina D), y para el tratamiento para mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis. El ibandronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de osteoporosis postmenopáusica. Tomado como píldora una vez al mes (150 mg), el ibandronato debería tomarse el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. El risedronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de osteoporosis postmenopáusica. Tomado diariamente (dosis de 5 mg) o semanalmente (dosis de 35 mg o dosis de 35 mg con calcio), el risedronato retarda la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna y no de columna. El risedronato está también aprobado para uso por hombres y mujeres para prevenir y/o tratar osteoporosis inducida por glucocorticoides que es el resultado del uso a largo plazo de estas medicaciones (concretamente, prednisona o cortisona). La calcitonina es una hormona de origen natural implicada en la regulación del calcio y el metabolismo óseo. En mujeres con más de 5 años de menopausia, la calcitonina retarda la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea de columna y puede aliviar el dolor asociado a fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de fracturas de columna. La calcitonina está disponible como una inyección (50-100 UI diarias) o pulverizador nasal (200 UI diarias). La terapia de estrógenos (ET)/terapia hormonal (HT) está aprobada para la prevención de osteoporosis. Se ha mostrado que la ET reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea tanto en columna como en cadera y reduce el riesgo de fracturas de cadera y columna en mujeres postmenopáusicas. La ET se administra lo más comúnmente en forma de una píldora o parche dérmico que suministra una dosis baja de aproximadamente 0,3 mg al día o una dosis estándar de aproximadamente 0,625 mg al día y es eficaz incluso cuando se inicia después de los 70 años. Cuando se toma estrógeno solo, puede aumentar el riesgo de la mujer de desarrollar cáncer del revestimiento uterino (cáncer de endometrio). Para eliminar este riesgo, los profesionales sanitarios prescriben la hormona progestina en combinación con estrógeno (terapia de reemplazo hormonal o HT) para aquellas mujeres que tienen el útero intacto. La ET/HT alivia los síntomas de menopausia y se ha mostrado que tiene un efecto beneficioso sobre la salud ósea. Los efectos secundarios pueden incluir hemorragia vaginal, sensibilidad del pecho, alteraciones del ánimo y enfermedad de la vesícula biliar. El raloxifeno, 60 mg al día, está aprobado para la prevención y el tratamiento de osteoporosis postmenopáusica. Es de una clase de fármacos llamada moduladores selectivos de receptor de estrógeno (SERM) que se han desarrollado para proporcionar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin sus desventajas potenciales. El raloxifeno aumenta la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. Aún no están disponibles datos para demostrar que el raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras no de columna. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y hombres con alto riesgo de fractura. Esta medicación estimula la formación de hueso y aumenta significativamente la densidad mineral ósea. En mujeres postmenopáusicas se señaló reducción de fracturas en columna, cadera, pie, costillas y muñeca. En hombres, se señaló reducción de fracturas en columna, pero había insuficientes datos para evaluar la reducción de fracturas en otros sitios. La teriparatida se autoadministra como una inyección diaria durante hasta 24 meses.

[0138] Como se muestra en la presente memoria, los antagonistas de ActRIIb son también útiles en la promoción del crecimiento muscular, y como tales pueden ser útiles en un hospedador de trastornos relacionados con músculos. Las afecciones relacionadas con músculos ejemplares incluyen trastornos neuromusculares (p.ej., distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y consunción muscular asociada a EPOC), síndrome de consunción muscular, sarcopenia, caquexia, trastornos del tejido adiposo (p.ej., obesidad), diabetes de tipo 2 y enfermedad degenerativa ósea (p.ej., osteoporosis). Otras afecciones ejemplares incluyen trastornos musculodegenerativos y neuromusculares, reparación de tejidos (p.ej., curación de heridas),

enfermedades neurodegenerativas (p.ej., esclerosis lateral amiotrófica), trastornos inmunológicos (p.ej., trastornos relacionados con una proliferación o función anormal de linfocitos) y obesidad o trastornos relacionados con una proliferación anormal de adipocitos.

5 **[0139]** En ciertas realizaciones, se usan los antagonistas de ActRIIb de la invención como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. El término “distrofia muscular” hace referencia a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por un debilitamiento y deterioro gradual de los músculos esqueléticos y a veces de los músculos cardíacos y respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por una consunción y debilidad muscular progresivos que empiezan con cambios microscópicos en el músculo. A
10 medida que los músculos degeneran con el tiempo, desciende la fuerza muscular de la persona. Las distrofias musculares ejemplares que pueden tratarse con un régimen que incluye los polipéptidos de ActRIIb en cuestión incluyen: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), distrofia muscular de las cinturas (LGMD), distrofia muscular facioescapulohumeral (FEH o DMFEH) (también conocida como de Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (DMM) (también conocida como
15 enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (DMOF), distrofia muscular distal (DD) y distrofia muscular congénita (DMC).

[0140] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) se describió por primera vez por el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en la década de 1860. La distrofia muscular de Becker (DMB) se nombra
20 según el doctor alemán Peter Emil Becker, que describió por primera vez esta variante de DMD en la década de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en hombres, afectando a uno de cada 3.500 niños. La DMD aparece cuando se rompe el gen de distrofina, localizado en el brazo corto del cromosoma X. Puesto que los hombres portan solo una copia del cromosoma X, tienen solo una copia del gen de distrofina. Sin la proteína distrofina, el músculo se daña fácilmente durante los ciclos de contracción y relajación. Aunque tempranamente en la
25 enfermedad el músculo se compensa por regeneración, más tarde las células progenitoras musculares no pueden seguir el ritmo del daño continuo y el músculo sano se reemplaza por tejido fibrograso no funcional. El efecto dual sobre músculo y hueso puede ser útil en pacientes de distrofia muscular.

[0141] La DMB es el resultado de diferentes mutaciones en el gen de distrofina. Los pacientes de DMB tienen
30 algo de distrofina, pero de insuficiente cantidad o de mala calidad. Tener algo de distrofina protege los músculos de las personas con DMB de una degeneración tan mala o rápida como los de aquellos con DMD.

[0142] Por ejemplo, investigaciones recientes demuestran que bloquear o eliminar la función de GDF8 (un ligando de ActRIIb) *in vivo* puede tratar eficazmente al menos ciertos síntomas de pacientes de DMD o DMB. Por
35 tanto, los antagonistas de ActRIIb en cuestión pueden actuar como inhibidores de GDF8 (antagonistas) y constituyen un medio alternativo de bloqueo de las funciones de GDF8 y/o ActRIIb *in vivo* en pacientes de DMD o DMB. Se ha mostrado que una proteína ActRIIb-Fc aumenta la masa muscular en un modelo de distrofia muscular en ratón (véase la publicación de EE.UU. n° 2009/0005308).

[0143] De forma similar, los antagonistas de ActRIIb en cuestión proporcionan un medio eficaz para aumentar la masa muscular en otras afecciones patológicas que necesitan crecimiento muscular. Por ejemplo, la ELA, también
40 llamada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de neuronas motoras) es un trastorno del SNC crónico incurable e imparable que ataca las neuronas motoras, los componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos esqueléticos. En ELA, las neuronas motoras se deterioran y dado el caso mueren, y aunque el cerebro de la persona
45 normalmente permanece totalmente funcional y alerta, la orden de moverse no alcanza nunca los músculos. La mayoría de personas con ELA son de entre 40 y 70 años de edad. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son aquellas que conducen a los brazos o piernas. Aquellos con ELA pueden tener problemas para andar, pueden dejar caer cosas, caerse, arrastrar las palabras y reír o llorar incontroladamente. Dado el caso, los músculos de los miembros empiezan a atrofiarse por la falta de uso. Esta debilidad muscular se volverá debilitante y la persona
50 necesitará una silla de ruedas o se volverá incapaz de actividad fuera de la cama. La mayoría de pacientes con ELA mueren por insuficiencia respiratoria o por complicaciones de una asistencia ventilatoria como neumonía a los 3-5 años desde el inicio de la enfermedad. Se ha mostrado que una proteína ActRIIb-Fc mejora la apariencia, masa muscular y esperanza de vida de un modelo de ELA en ratón (véase la publicación de EE.UU. 2009/0005308).

[0144] La masa muscular aumentada inducida por antagonistas de ActRIIb podría beneficiar también a aquellos que padecen enfermedades de consunción muscular. Se ha observado que la expresión de GDF8 se correlaciona inversamente con la masa libre de grasa en seres humanos y que la expresión aumentada del gen de GDF8 está asociada a la pérdida de peso en hombres con síndrome de consunción por SIDA. Al inhibir la función de GDF8 en pacientes de SIDA, pueden paliarse al menos ciertos síntomas del SIDA, si no eliminarse completamente,

mejorando por tanto significativamente la calidad de vida en pacientes de SIDA.

[0145] Puesto que la pérdida de la función de GDF8 (un ligando de ActRIIb) está también asociada a la pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes, los antagonistas de ActRIIb en cuestión pueden usarse además como agente terapéutico para retardar o prevenir el desarrollo de obesidad y diabetes de tipo II. Este enfoque se confirma y apoya por los datos mostrados en la presente memoria, con los que se mostró que una proteína ActRIIb-Fc mejora el estado metabólico en ratones obesos.

[0146] El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer está entre los aspectos más debilitantes y potencialmente mortales del cáncer. La pérdida de peso progresiva en el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer es un rasgo común de muchos tipos de cáncer y es responsable no solo de una mala calidad de vida y una mala respuesta a la quimioterapia, sino también de un tiempo de supervivencia más corto que el encontrado en pacientes con tumores comparables sin pérdida de peso. Asociada a la anorexia, la consunción de tejido graso y muscular, el sufrimiento psicológico y la menor calidad de vida, la caquexia surge por una interacción compleja entre el cáncer y el hospedador. Es una de las causas más comunes de muerte entre los pacientes de cáncer y está presente en un 80 % al morir. Es un ejemplo complejo del caos metabólico que afecta al metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas. Los tumores producen anomalías tanto directas como indirectas, dando como resultado anorexia y pérdida de peso. Actualmente, no hay tratamiento para controlar o revertir el proceso. El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer afecta a la producción de citocinas, la liberación de factores movilizadores de lípidos e inductores de la proteólisis y alteraciones del metabolismo intermedio. Aunque la anorexia es común, una ingesta de alimento disminuida sola es incapaz de dar cuenta de los cambios de la composición corporal observados en pacientes de cáncer, y aumentar la ingesta de nutrientes es incapaz de revertir el síndrome de consunción. La caquexia debería sospecharse en pacientes con cáncer si ocurre una pérdida de peso involuntaria de más de un 5 % del peso premórbido dentro de un periodo de 6 meses.

[0147] Puesto que se ha mostrado que la sobreexpresión sistémica de GDF8 en ratones adultos induce una profunda pérdida muscular y grasa análoga a la observada en síndromes de caquexia humanos, los antagonistas de ActRIIb en cuestión puede usarse beneficiosamente como composiciones farmacéuticas para prevenir, tratar o paliar los síntomas de síndrome de caquexia, donde se desea el crecimiento muscular.

[0148] En otros supuestos, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para regular el contenido de grasa corporal en un animal y para tratar o prevenir afecciones relacionadas con el mismo, y particularmente afecciones comprometedoras de la salud relacionadas con el mismo. Según la presente divulgación, regular (controlar) el peso corporal, puede hacer referencia a reducir o aumentar el peso corporal, reducir o aumentar la tasa de ganancia de peso corporal o aumentar o reducir la tasa de pérdida de peso, e incluye también mantener activamente, o no cambiar significativamente, el peso corporal (p.ej., frente a influencias externas o internas que pueden aumentar o disminuir de otro modo el peso corporal). Un supuesto de la presente divulgación se refiere a regular el peso corporal mediante la administración a un animal (p.ej., un ser humano) necesitado de ello de un antagonista de ActRIIb.

[0149] En un supuesto específico, la presente divulgación se refiere a procedimientos 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 con riesgo o que padecen obesidad. En otro supuesto específico, la presente divulgación está dirigida a procedimientos y compuestos para tratar un animal que es incapaz de ganar o retener peso (p.ej., un animal con un síndrome de consunción). Dichos procedimientos son eficaces para aumentar el peso y/o masa corporal o para reducir la pérdida de peso y/o masa corporal, para mejorar afecciones asociadas a o causadas por un peso y/o masa corporal indeseablemente bajos (p.ej., no saludables).

7. Dosificación

[0150] En ciertos supuestos, la divulgación proporciona procedimientos para dosificar a un paciente un polipéptido de ActRIIb. Los procedimientos de la divulgación incluyen administrar una proteína ActRIIb a un paciente con un plan de dosificación que proporcione una concentración sérica óptima de la proteína ActRIIb que se mantenga durante un periodo de tiempo deseado. Un paciente puede dosificarse con un plan que implique una combinación deseada de la cantidad de polipéptido de ActRIIb administrada al paciente así como la frecuencia con que se administra el polipéptido de ActRIIb al paciente. Un polipéptido de ActRIIb para uso en dicho plan de dosificación puede ser cualquiera de los divulgados en la presente memoria, tal como un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20, o que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada

de las SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17 o 20. Un polipéptido de ActRIIb puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIb natural, tal como uno que comprenda al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1-3 o una secuencia de la SEQ ID NO: 2 que carece de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola"). En ciertas realizaciones, el polipéptido de ActRIIb de la invención comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con una porción de ActRIIb, en la que el extremo N del polipéptido de ActRIIb corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 19-25 de la SEQ ID NO:1 y el extremo C del polipéptido de ActRIIb corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO:1. El polipéptido de ActRIIb es una proteína de fusión ActRIIb-Fc divulgada en la presente memoria.

10

[0151] Puede dosificarse a un paciente para conseguir una concentración sérica óptima del polipéptido de ActRIIb. Una concentración sérica óptima puede ser, por ejemplo, una concentración sérica que sea suficiente para promover un efecto biológico deseado *in vivo*. Dichos efectos biológicos incluyen cualquiera de los efectos terapéuticos divulgados en la presente memoria, incluyendo promoción del crecimiento óseo, aumento de la densidad ósea, tratamiento o prevención de un trastorno asociado a una densidad ósea baja, tratamiento de trastornos neuromusculares, trastornos del tejido adiposo, trastornos metabólicos, trastornos neurodegenerativos, trastornos de consunción muscular o cáncer.

15

[0152] Como se divulga en la presente memoria, los polipéptidos de ActRIIb de la divulgación demuestran una eficacia biológica consistente cuando los pacientes alcanzan y mantienen una concentración sérica de polipéptido de ActRIIb de al menos 10 µg/ml. Por lo tanto, en ciertos supuestos, puede administrarse a un paciente un polipéptido de ActRIIb con un plan de dosificación que mantenga una concentración sérica de ActRIIb de al menos 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml o al menos 70 µg/ml. En ciertos supuestos, puede ser deseable mantener la concentración sérica de polipéptido de ActRIIb dentro de un intervalo óptimo, tal como por ejemplo dentro de un intervalo de aproximadamente 8 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml (p.ej., 8-100 µg/ml, 8-70 µg/ml, 8-50 µg/ml, 8-40 µg/ml, 8-35 µg/ml, 8-30 µg/ml, 8-25 µg/ml, 8-20 µg/ml, 8-15 µg/ml, 8-12,5 µg/ml, 8-10 µg/ml, 10-100 µg/ml, 10-70 µg/ml, 10-50 µg/ml, 10-40 µg/ml, 10-35 µg/ml, 10-30 µg/ml, 10-25 µg/ml, 10-20 µg/ml, 10-15 µg/ml, 10-12,5 µg/ml, 12-100 µg/ml, 12-70 µg/ml, 12-50 µg/ml, 12-40 µg/ml, 12-35 µg/ml, 12-30 µg/ml, 12-25 µg/ml, 12-20 µg/ml, 12-15 µg/ml, 15-100 µg/ml, 15-70 µg/ml, 15-50 µg/ml, 15-40 µg/ml, 15-35 µg/ml, 15-30 µg/ml, 15-25 µg/ml, 15-20 µg/ml, 20-70 µg/ml, 20-50 µg/ml, 20-35 µg/ml o 20-30 µg/ml).

30

[0153] En ciertas realizaciones, los planes de dosificación de la divulgación incluyen administrar un polipéptido de ActRIIb de la invención en una cantidad y en un intervalo suficiente para mantener una concentración sérica deseada de la proteína ActRIIb durante un periodo de tiempo deseado. La duración deseable para mantener una concentración sérica de ActRIIb deseada en un paciente dependerá del efecto biológico deseado (p.ej., el tratamiento de un trastorno óseo). Por ejemplo, puede administrarse a un paciente una proteína ActRIIb en una cantidad y en un intervalo suficiente para mantener la concentración sérica deseada a lo largo de aproximadamente una semana a un año o más (p.ej., mantener la concentración sérica deseada durante 5 días, 7 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 20 días, 25 días, 30 días, una a dos semanas, una semana a un mes, dos meses, cuatro meses, seis meses, un año o dos años o más). Preferiblemente, se administra a un paciente una proteína ActRIIb en una cantidad suficiente para mantener la concentración sérica deseada a lo largo de un tratamiento terapéutico. El plan de dosificación es suficiente para mantener la concentración sérica deseada de ActRIIb entre los intervalos de dosificación (p.ej., entre las administraciones de ActRIIb).

45

[0154] Como se divulga en la presente memoria, pueden conseguirse los efectos biológicos de los polipéptidos de ActRII con dosis de 0,3 mg/kg o mayores. Por lo tanto, en ciertos supuestos, puede dosificarse a un paciente aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg (p.ej., 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 7,0, 10,0, 12,0 o 15,0 mg/kg) de un polipéptido de ActRIIb. En realizaciones preferidas, se administra a un paciente al menos 1,0 mg/kg. Además, los experimentos mostrados a continuación indican que la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIb-Fc está entre aproximadamente 10 y 16 días. Por lo tanto, en ciertos aspectos, puede dosificarse a un paciente una proteína ActRIIb de la divulgación al menos una vez al mes (p.ej., una vez cada 5-30 días, 10-16 días, 5 días, 7 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días o 16 días; o con una base mensual o bimensual).

50

55 8. Composiciones farmacéuticas

[0155] En ciertas realizaciones, se formulan los polipéptidos de ActRIIb de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido de ActRIIb solo o como componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden

formularse para administración en cualquier modo conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

- [0156]** En ciertos supuestos, el procedimiento terapéutico de la divulgación incluye administrar la composición sistémica o localmente, como implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención está en una forma exenta de pirógenos fisiológicamente aceptable. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de antagonistas de ActRIIb que pueden incluirse también opcionalmente en la composición como se describe anteriormente pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos en cuestión (p.ej., polipéptidos de ActRIIb) en los procedimientos de la divulgación.
- [0157]** Típicamente, los antagonistas de ActRIIb se administrarán por vía parenteral, y particularmente intravenosa o subcutánea. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos de 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 justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de portadores 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) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
- [0158]** Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para suministro a un sitio de tejido diana (p.ej., hueso o músculo). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (p.ej., polipéptidos de ActRIIb) a un sitio de tejido diana, proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de resorberse en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar la liberación lenta de polipéptidos de ActRIIb. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.
- [0159]** La elección del material de matriz está basada en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades interfásicas. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatito, poli(ácido láctico) y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Las matrices adicionales comprenden proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos de material anteriormente mencionados, tales como poli(ácido láctico) e hidroxiapatito o colágeno y fosfato de tricalcio. En las biocerámicas, puede alterarse la composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato, y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.
- [0160]** En ciertos supuestos, los procedimientos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, p.ej. en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas masticables (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos o como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como lavados bucales y similares, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente puede administrarse también como bolo, electuario o pasta.
- [0161]** En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), pueden mezclarse uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores 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) humectantes tales como glicerol; (4) agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución tales como parafina; (6) acelerantes de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humidificantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbente tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes tales como talco, estearato de calcio,

estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tamponadores. Pueden emplearse también composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellena blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar la leche, así como

5 [0162] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas puede contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como

10 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, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos. Aparte de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también coadyuvantes tales como agentes

15 humidificantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

[0163] Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina,

20 metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

[0164] Las composiciones de la invención pueden contener también coadyuvantes tales como conservantes, agentes humidificantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por

25 ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser deseable también incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, puede causarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

30 [0165] Se entiende que el régimen de dosificación se determinará por el médico a cargo considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos de la invención en cuestión. Los diversos factores incluyen, pero sin limitación, la cantidad de peso de hueso que se desee formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio de daño óseo, la afección del hueso dañado, la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda contribuir a la pérdida ósea, el momento de administración y otros factores clínicos.

35 Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y los tipos de compuestos de la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final puede afectar también a la dosificación. Puede monitorizarse la progresión mediante valoración periódica del crecimiento y/o reparación óseos, por ejemplo por rayos X (incluyendo DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

40

[0166] Los experimentos mostrados a continuación demuestran que los efectos de ActRIIb-Fc sobre el hueso pueden conseguirse con una única dosis de 1 mg/kg o mayor. La semivida sérica observada de la molécula es de entre alrededor de 10 y 16 días. Por tanto, puede conseguirse un nivel sérico eficaz mantenido, por ejemplo,

45 dosificando aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg en base semanal o bisemanal. Por ejemplo, podrían usarse dosis de 0,3, 0,5, 1, 2, 3 o 5 mg/kg, o valores intermedios, una vez cada 7 días, una vez cada 10 día, una vez cada 15 días o con base mensual o bimensual. Se proporcionan otros regímenes de dosificación ejemplares anteriormente.

[0167] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona también terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos de ActRIIb. Dicha terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de

50 secuencias polinucleotídicas de ActRIIb en células o tejidos que tienen los trastornos listados anteriormente. Puede conseguirse el suministro de secuencias polipeptídicas de ActRIIb usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere para suministro terapéutico de secuencias polinucleotídicas de ActRIIb el uso de liposomas orientados.

55 [0168] Los diversos vectores víricos que pueden utilizarse para terapia génica como se enseña en la presente memoria incluyen adenovirus, herpesvirus, virus Vaccinia o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retrovírico es un derivado de un retrovirus de murino o ave. Los ejemplos de vectores retrovíricos en que puede insertarse un único gen extraño incluyen, pero sin limitación: virus de leucemia de murino Moloney (MoMuLV), virus de sarcoma de murino Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario de murino

- (MuMTV) y virus de sarcoma de Rous (RSV). Una serie de vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para marcador seleccionable de modo que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovíricos pueden hacerse específicos de diana enlazando, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. Se logra la orientación preferida usando un anticuerpo. Los especialistas en la materia reconocerán que pueden insertarse secuencias polinucleotídicas específicas en el genoma retrovílico o enlazarse con una cubierta vírica para permitir el suministro específico de diana del vector retrovílico que contiene el polinucleótido de ActRIIb. En una realización preferida, el vector está orientado a hueso o cartílago.
- 10 **[0169]** Como alternativa, las células de cultivo de tejido pueden transfectarse directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovíricos gag, pol y env, mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectan entonces con el plásmido de vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovílico en el medio de cultivo.
- 15 **[0170]** Es otro sistema de suministro orientado para polinucleótidos de ActRIIb un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y suministrarse a células en forma biológicamente activa (véase, p.ej., Fraley, y col., *Trends Biochem. Sci.*, 6: 77, 1981). Los procedimientos para una transferencia génica eficaz usando un vehículo liposómico son conocidos en la materia, véase, p.ej., Mannino, y col., *Biotechniques*, 6: 682, 1988. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. Pueden usarse también otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.
- 20 **[0171]** Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearyl fosfatidilcolina. La orientación de liposomas es también posible basándose, por ejemplo, en la especificidad de órgano, especificidad de célula y especificidad de orgánulo, y es conocida en la materia.

EJEMPLIFICACIÓN

- 35 **[0172]** Habiéndose descrito en general ahora la invención, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertas realizaciones y de realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1: Proteínas de fusión ActRIIb-Fc

- 40 **[0173]** Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIb soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIb humana fusionado con un dominio Fc humano o de ratón con un ligador mínimo (tres aminoácidos de glicina) entremedias. Se hace referencia a los constructos como ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc, respectivamente.

- 45 **[0174]** La ActRIIb-hFc se muestra a continuación purificada de líneas celulares de CHO (SEQ ID NO: 13)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
VPVIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

- [0175]** Se expresaron las proteínas ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc en líneas celulares CHO. Se consideraron tres

secuencias líder diferentes:

- (i) melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 14)
- (ii) activador de plasminógeno de tejido (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 15)
- (iii) nativa: MGAALKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 16).

5

[0176] La forma seleccionada emplea la líder TPA y tiene la siguiente secuencia aminoacídica no procesada:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

10 **[0177]**

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 18):

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
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG
GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
TCTTCTCTT CCCCCAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGCCA
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0178] La secuenciación N-terminal del material producido en células CHO producía material que revelaba una secuencia importante de -GRGEAE (SEQ ID NO: 19). Especialmente, otros constructos reseñados en la bibliografía empiezan con una secuencia -SGR...

[0179] La purificación podía conseguirse 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 de Q-Sepharose, cromatografía de fenil-Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración vírica e intercambio de tampón.

[0180] Las proteínas de fusión ActRIIb-Fc se expresaron también en células HEK293 y células COS. Aunque el material de todas las líneas celulares y condiciones de cultivo razonables proporcionó proteína con actividad formadora de músculo *in vivo*, se observó variabilidad en la potencia quizás respecto a la selección de línea celular y/o condiciones de cultivo. Se consiguió la purificación como se describe en la memoria descriptiva anterior.

Ejemplo 2: Generación de mutantes de ActRIIb-Fc

[0181] Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIb y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre ActRIIb extracelular y un dominio Fc. La fusión ActRIIb-Fc de fondo tiene la secuencia (porción Fc subrayada)(SEQ ID NO:20):

5 SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP
TAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

[0182] Se introdujeron diversas mutaciones, incluyendo truncamientos N- y C-terminales, en la proteína ActRIIb-Fc de fondo. Basándose en los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que estos constructos, si se expresan con una líder TPA, carezcan de la serina N-terminal. Se generaron mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIb por mutagénesis por PCR. Después de la PCR, se purificaron los fragmentos mediante una columna Qiagen, se digirieron con SfoI y AgeI y se purificaron por gel. Se ligaron estos fragmentos en el vector de expresión pAID4 (véase el documento WO2006/012627) de tal modo que, tras el ligamiento, se creara una quimera de fusión con IgG1 humana. Tras transformación en *E. coli* DH5 alfa, se recogieron colonias y se aislaron los ADN. Para los constructos de murino (mFc), se sustituyó la IgG2a de murino por la IgG1 humana. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

[0183] Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T por transfección transitoria. En resumen, se establecieron células HEL293T en una centrifuga de 500 ml a 6×10^5 células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) con 250 ml de volumen y se hicieron crecer durante una noche. El día siguiente, se trataron estas células con complejo ADN:PEI (1:1) a 0,5 ug/ml de concentración de ADN final. Después de 4 horas, se añadieron 250 ml de medio y se hicieron crecer las células durante 7 días. Se recolectó el medio acondicionado por centrifugación de las células y se concentró.

[0184] Se purificaron los mutantes usando una variedad de técnicas incluyendo, por ejemplo, columna de proteína A, y se eluyeron con tampón de glicina a bajo pH (3,0). Después de la neutralización, se dializaron estos frente a PBS.

[0185] Se produjeron también mutantes en células CHO mediante metodología similar.

[0186] Se ensayaron los mutantes en ensayos de unión y/o bioensayos descritos a continuación. En algunos casos, se efectuaron los ensayos con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas.

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

[0187] Se usó un ensayo del gen indicador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIb-Fc sobre a señalización por GDF-11 y activina A. Línea celular; rhabdomyosarcoma humano (derivado de músculo). Vector indicador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler y col., 1998, *EMBO* 17: 3091-3100.) Véase la Figura 1. El motivo CAGA12 está presente en genes sensibles a TGF-beta (gen de PAI-1), así que este vector es de uso general para factores de señalización a través de Smad2 y 3.

Día 1: Se dividen células A-204 en una placa de 48 pocillos.

Día 2: Se transfectan células A-204 con 10 ug de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12(10 ug)+ pRLCMV (1 ug) y Eugene.

Día 3: Se añaden factores (diluidos en medio + BSA al 0,1 %). Los inhibidores tienen que preincubarse con los factores durante 1 h antes de añadir a las células. 6 h después, se aclaran las células con PBS y se lisan las células.

[0188] Esto es seguido por un ensayo de luciferasa. En ausencia de cualquier inhibidor, la activina A mostraba una estimulación de 10 veces de la expresión de gen indicador y una DE50~ 2 ng/ml. GDF-11: 16 veces de estimulación, DE50:~ 1,5 ng/ml.

[0189] La ActRIIb(R64, 20-134) es un potente inhibidor de la actividad de activina, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. Se ensayaron las variantes en este ensayo también.

5 Ejemplo 4: Ensayo clínico humano, dosis única ascendente

[0190] Se administró la proteína ActRIIb(20-134)-hFc descrita en el Ejemplo 1 a pacientes humanos en un estudio aleatorizado de doble ciego controlado por placebo que se realizó para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres postmenopáusicas sanas. Se asignaron aleatoriamente 48 sujetos en 6 cohortes de 8 sujetos para recibir una única dosis de ActRIIb-hFc o placebo (6 p. activo:2 placebo). Los niveles de dosis oscilaban de 0,02 a 3,0 mg/kg administrados por vía subcutánea (SC). Se siguieron todos los sujetos durante 57 días. Se excluyeron sujetos de la participación del estudio si tomaron medicaciones que afectaran al metabolismo óseo hasta 6 meses antes de la entrada en el estudio. Se realizaron evaluaciones de seguridad después de cada cohorte para determinar el incremento de dosis. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), se valoró también la actividad biológica de ActRIIb-hFc mediante la medida de marcadores biológicos de formación y resorción de hueso y los niveles de FSH.

[0191] No se reseñaron eventos adversos graves en este estudio.

[0192] El análisis PK de ActRIIb-hFc exhibió un perfil lineal con la dosis, y una semivida media de aproximadamente 10-16 días (véase la Figura 2). El área bajo la curva (AUC) para ActRIIb-hFc estaba relacionada linealmente con la dosis, y la absorción después de la dosificación SC era esencialmente completa. A dosis mayores, la ActRIIb-hFc causaba aumentos de la masa corporal magra (LBM), como se demostró usando barridos de absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) (véase la Figura 3). El aumento medio de la LBM en comparación con el valor basal era de un 2,6 % (0,92 kg) a los 2 meses después de la dosis de 3 mg/kg. En el grupo tratado con placebo disminuyó en un 0,2 %. Más sujetos a las dosis mayores (1 y 3 mg/kg) tenían un aumento de al menos 0,5 kg en la LBM tan pronto como 15 días después de la dosificación con ActRIIb-hFc, que se mantenía hasta el día 57, en comparación con placebo y las dosis menores (véase la Figura 4). En los sujetos dosificados con ActRIIb-hFc 1 y 3 mg/kg, se midieron cambios significativos dependientes de la dosis de biomarcadores séricos del metabolismo graso (adiponectina aumentada y leptina disminuida) (véanse las Figuras 5 y 6). La ActRIIb-hFc causó un aumento rápido y sostenido dependiente de la dosis de los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP), que es un marcador del crecimiento óseo anabólico, y una disminución dependiente de la dosis del telopéptido de colágeno de tipo 1 C-terminal (CTX), que es un marcador de resorción ósea (véanse las Figuras 7 y 8). Los niveles de BSAP mostraron efectos casi saturantes a la dosis máxima de fármaco, indicando que podían conseguirse los efectos semimáximos sobre este biomarcador óseo anabólico a una dosificación de 1 mg/kg o menor. Estos cambios de biomarcador óseo se mantenían durante aproximadamente 57 días a los niveles de dosis máximos probados. Había también una disminución dependiente de la dosis de los niveles séricos de FSH consistente con la inhibición de activina (véase la Figura 9).

[0193] Se observaron aumentos del volumen de músculo del muslo por imagenología de resonancia magnética (IRM) a los 29 días después de las dosis únicas de ActRIIb-hFc 1 y 3 mg/kg, con un aumento significativo a la dosis máxima (3 mg/kg) en comparación con placebo (véase la Figura 10). En particular, a los 29 días después de la administración de una dosis única de 3 mg/kg de ActRIIb-hFc, se observó un aumento de un 16,4 % del área muscular, un aumento de un 11,5 % del volumen muscular y una disminución de un 2,2 % de la grasa subcutánea. Se muestra en la Figura 11 el cambio porcentual medio desde el valor basal en el volumen de músculo del muslo el día 29 con los niveles de dosificación de 1 y 3 mg/kg en comparación con placebo.

[0194] Una dosis única de ActRIIb-hFc procurada a mujeres postmenopáusicas sanas era segura y bien tolerada para el intervalo de niveles de dosis probado. Este ensayo clínico demuestra que, en seres humanos, la ActRIIb-hFc es un agente osteoanabólico con evidencias biológicas tanto de un aumento de la formación ósea como una disminución de la resorción ósea. La ActRIIb-hFc aumenta también el tamaño y función muscular.

Ejemplo 5: Ensayo clínico humano, dosis ascendentes múltiples

[0195] Se realizó un ensayo aleatorizado de doble ciego, controlado por placebo, de dosis múltiple y con incremento de dosis para evaluar principalmente la seguridad, tolerabilidad, efectos PK y PD de ActRIIb-hFc en mujeres postmenopáusicas sanas. El estudio incluía 6 cohortes de 10 sujetos cada una. Se asignaron aleatoriamente los sujetos a cada cohorte para recibir ActRIIb-hFc o placebo (8 sujetos p. activo y 2 placebo por cohorte).

[0196] Se dosificaron las cohortes como sigue: La Cohorte 1 (0,1 mg/kg), Cohorte 2 (0,3 mg/kg) y Cohorte 3 (1 mg/kg) recibieron ActRIIb-hFc por vía subcutánea (SC) cada 14 días para un total de 3 dosis los días 1, 15 y 29. La Cohorte 4 (1 mg/kg), Cohorte 5 (2 mg/kg) y Cohorte 6 (3 mg/kg) recibieron ActRIIb-hFc SC cada 28 días para un total de 2 dosis los días 1 y 29.

[0197] Se evaluaron los siguientes datos: eventos adversos, pruebas de laboratorio clínico (hematología, química, análisis de orina, pruebas de función endocrina, pruebas de función suprarrenal, pruebas de estimulación de ACTH), signos vitales incluyendo presión sanguínea en posición supina (después de al menos 5 minutos) y en pie (después de 2 minutos $\pm$ 30 segundos), ECG, ecocardiograma (ECHO), exámenes físicos y anticuerpos antifármaco. Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración sérica de ActRIIb-hFc (AUC), concentración máxima (C_{máx}), tiempo hasta la concentración máxima (T_{máx}), semivida de eliminación (t_{1/2}), aclaramiento (Cl/F) y volumen de distribución (V_z/F). Farmacodinámica: FSH, masa corporal magra medida por barridos de DXA de cuerpo completo, densidad mineral ósea (BMD) medida por barridos de DXA de columna lumbar, cadera y cuerpo entero. Tamaño muscular medido por barridos de IRM en las cohortes 3-6 y otros marcadores de efecto farmacodinámico.

[0198] Como se muestra en la Figura 14, las concentraciones séricas de ActRIIb-hFc estaban relacionadas con la cantidad y frecuencia de dosis. Especialmente, las dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg procuradas cada 28 días conseguían altas concentraciones máximas con depresiones marcadas. La dosis de 1 mg/kg procurada cada 14 días conseguía una concentración creciente con depresiones menores. Después de la segunda dosis, 1 mg/kg procurado cada 14 días mantenía una concentración sérica media en los pacientes por encima de aproximadamente 12 microgramos/ml, mientras que las dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg procuradas cada 28 días exhibían depresiones de una media de aproximadamente 8 y 10 microgramos/ml, respectivamente. Como se muestra en la Figura 15, las depresiones en la concentración sérica se reflejaban en los efectos sobre la FSH. Se cree que la producción de FSH está estimulada por activinas, y por lo tanto el uso de un antagonista de activina tal como ActRIIb-hFc se espera que inhiba la producción de FSH. De hecho, todas las dosis de ActRIIb-hFc exhibían cierta inhibición de FSH. Esto se muestra por las señales que caen por debajo del eje X en la Figura 15. De forma interesante, la dosis de 1 mg/kg procurada cada 14 días no exhibía una disminución media de la inhibición de FSH durante el periodo de dosificación, mientras que las dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg procuradas cada 28 días exhibían un aumento sustancial de la producción de FSH (por ello, una disminución de la supresión de FSH) que correspondía a la depresión de la concentración sérica (más o menos entre los días de estudio 15 y 36). Se concluye que la dosificación de proteínas ActRIIb-hFc de manera que se permita caer la concentración sérica tan bajo como a 8 o 10 microgramos/ml causa una liberación transitoria de la supresión de la señalización de activina por el fármaco y, quizás, una liberación transitoria de la supresión de otros ligandos, tales como miostatina o GDF-11. Especialmente, la dosis de 1 mg/kg procurada cada 14 días parecía causar un mayor aumento de la masa muscular, medido por la masa magra corporal total (véase la Figura 16) que las dosis menos frecuentes de 2 mg/kg y 3 mg/kg. Aunque los pacientes con dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg procuradas cada 28 días recibían un total de 4 o 6 mg/kg de fármaco durante el estudio, los pacientes con la dosis de 1 mg/kg procurada cada 14 días recibían un total de solo 3 mg/kg de fármaco durante el estudio. No obstante, la dosis menor más frecuente proporcionaba un mayor efecto aparente sobre la masa muscular (exhibido en este estudio como una tendencia que no alcanza significación estadística). Se espera que esta eficacia superior a una menor dosis sea debida a la supresión de ligando más mantenida que ocurre con el régimen de dosificación más frecuente, como se muestra por los efectos sobre FSH. Como consecuencia, se espera que el régimen de dosificación que mantiene una concentración sérica por encima de aproximadamente 8, 10 o 12 microgramos por ml proporcione una eficacia óptima para fármacos basados en el modo de acción de ActRIIb-hFc. Esta conclusión debería ser aplicable a un amplio conjunto de proteínas ActRIIb-hFc, independientemente de la semivida sérica, a condición de que dichas proteínas tengan una afinidad por activinas y miostatina/GDF-11 que esté en el mismo intervalo que para ActRIIb-hFc de tipo silvestre.

[0199] Aunque se han discutido realizaciones específicas de la materia en cuestión, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Resultarán evidentes muchas variaciones para los especialistas en la materia tras la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes. El alcance completo de la invención debería determinarse por referencia a las reivindicaciones.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ACCELERON PHARMA INC.
<120> ANTAGONISTAS DE ACTRIIB Y DOSIFICACIÓN Y USOS DE LOS MISMOS
<130> P38540EP-PCT

<140> EP10816109.2
 <141> 09-09-2010
 <150> US 61/276.287
 <151> 09-09-2009
 5 <160> 35
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 512
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

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 Ala
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

ES 2 613 523 T3

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									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									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									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			

ES 2 613 523 T3

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 115
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 2

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 Ala 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

10
<210> 3
<211> 100
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
15 <400> 3

ES 2 613 523 T3

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 Ala 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
 100

<210> 4
 5 <211> 1539
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 613 523 T3

```

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg      60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcacg tactacaacg ccaactggga gctggagcgc      120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcaactgctac      180
gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat      240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggtgtac      300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatttgcc agaggctggg      360
ggcccggaa gtcacgtacga gccacccccg acagccccc cctgctcac ggtgctggcc      420
tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgcctggcctt ttggatgtac      480
cgccatcgca agccccctc cggtcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca      540
ccatcccctc tgggtgggct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc      600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca      660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga ggggagatct tcagcacacc tggcatgaag      720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag      780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac      840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac      900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gaggggcaca agccgtctat tgccacagg      960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt     1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc     1080
acgagacggg acatggctcc tgagggtgctc gaggggagcca tcaacttcca gagagatgcc     1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc     1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgagggaaga gattggccag     1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt     1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgaccat cgaggagtgc     1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgctc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg     1440
attcgagggt cggatcaacg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc     1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa                                1539

```

<210> 5
 5 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

tctgggctg	gggaggtga	gacacgggag	tgcatctact	acaacgcaa	ctgggagctg	60
gagcgacca	accagagcgg	cctggagcgc	tgcaaggcg	agcaggacaa	gcggctgcac	120
tgctacgcct	cctgggcaa	cagctctggc	accatcgagc	tcgtgaagaa	gggctgctgg	180
ctagatgact	tcaactgcta	cgataggcag	gagtgtgtgg	ccactgagga	gaacccccag	240
gtgtacttct	gctgctgtga	aggcaacttc	tgcaacgagc	gcttcactca	tttgccagag	300
gctggggggc	cggaagtcac	gtacgagcca	ccccgacag	ccccacc		348

	<210>	6
	<211>	225
5	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético
	<220>	
10	<221>	variante
	<222>	(43)..(43)
	<223>	puede ser Ala
	<220>	
	<221>	variante
15	<222>	(100)..(100)
	<223>	puede ser Ala
	<220>	
	<221>	variante
	<222>	(212)..(212)
20	<223>	puede ser Ala
	<400>	6

ES 2 613 523 T3

```

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 Asp 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 Lys 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 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210          215          220

```

```

<210> 7
<211> 343
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

```

ES 2 613 523 T3

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

ES 2 613 523 T3

[illegible]

<210>	8
<211>	317
5 <212>	PRT
<213>	<i>Homo sapiens</i>
<400>	8

ES 2 613 523 T3

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

ES 2 613 523 T3

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

<210> 9
 <211> 63
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

ES 2 613 523 T3

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys
50 55 60

<210> 10
<211> 25
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 10

Glu Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met
1 5 10 15

Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val
20 25

10
<210> 11
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
15 <400> 11

Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val
1 5 10 15

Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
20 25

<210> 12
20 <211> 262
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 12

ES 2 613 523 T3

```

Met Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Trp Pro Leu Pro Trp Gly Ala
1      5      10      15

Leu Ala Trp Ala Val Gly Phe Val Ser Ser Met Gly Ser Gly Asn Pro
      20      25      30

Ala Pro Gly Gly Val Cys Trp Leu Gln Gln Gly Gln Glu Ala Thr Cys
      35      40      45

Ser Leu Val Leu Gln Thr Asp Val Thr Arg Ala Glu Cys Cys Ala Ser
      50      55      60

Gly Asn Ile Asp Thr Ala Trp Ser Asn Leu Thr His Pro Gly Asn Lys
65      70      75      80

Ile Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gly Leu Val His Cys Leu Pro Cys Lys
      85      90      95

Asp Ser Cys Asp Gly Val Glu Cys Gly Pro Gly Lys Ala Cys Arg Met
      100      105      110

```

Leu Gly Gly Arg Pro Arg Cys Glu Cys Ala Pro Asp Cys Ser Gly Leu
115 120 125

Pro Ala Arg Leu Gln Val Cys Gly Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Arg Asp
130 135 140

Glu Cys Glu Leu Arg Ala Ala Arg Cys Arg Gly His Pro Asp Leu Ser
145 150 155 160

Val Met Tyr Arg Gly Arg Cys Arg Lys Ser Cys Glu His Val Val Cys
165 170 175

Pro Arg Pro Gln Ser Cys Val Val Asp Gln Thr Gly Ser Ala His Cys
180 185 190

Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Val Pro Ser Ser Pro Gly Gln Glu
195 200 205

Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Met Arg
210 215 220

Gln Ala Thr Cys Phe Leu Gly Arg Ser Ile Gly Val Arg His Ala Gly
225 230 235 240

Ser Cys Ala Gly Thr Pro Glu Glu Pro Pro Gly Gly Glu Ser Ala Glu
245 250 255

Glu Glu Glu Asn Phe Val
260

<210>

13

<211>

343

5 <212>

PRT

<213>

Secuencia artificial

<220>

<223>

Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400>

13

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

ES 2 613 523 T3

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					
	180		185		190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp					
	195		200		205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
	210		215		220
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg					
225		230		235	240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys					
	245		250		255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp					
	260		265		270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys					
	275		280		285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser					
	290		295		300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser					
305		310		315	320

		Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	325	330	335	
		Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	340			
	<210>	14				
	<211>	21				
5	<212>	PRT				
	<213>	Desconocido				
	<220>					
	<223>	Descripción de desconocido: péptido melitina de abeja melífera				
	<400>	14				
10		Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile	1	5	10	15
		Ser Tyr Ile Tyr Ala	20			
	<210>	15				
	<211>	22				
15	<212>	PRT				
	<213>	Desconocido				
	<220>					
	<223>	Descripción de desconocido: péptido activador de plasminógeno de tejido				
	<400>	15				
20		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>	16				
	<211>	20				
25	<212>	PRT				
	<213>	Desconocido				
	<220>					
	<223>	Descripción de desconocido: péptido líder nativo				
	<400>	16				
30		Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys	1	5	10	15
		Ser Ser Gly Ala	20			
	<210>	17				
	<211>	368				
35	<212>	PRT				
	<213>	Secuencia artificial				
	<220>					
	<223>	Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético				
	<400>	17				
40						

ES 2 613 523 T3

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

ES 2 613 523 T3

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>

18

<211>

1107

5 <212>

ADN

<213>

Secuencia artificial

<220>

<223>

Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400>

18

10

ES 2 613 523 T3

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgccccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcatcta ctacaacgcc      120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac      180
aagcggctgc actgctacgc ctcctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag      240
aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag      300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact      360
catttgccag aggtggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc      420
ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      480
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc      540
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      660

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      720
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaaccat ctccaagacc      780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc      840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      960
tcgcagcggc ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac gaggctctgc acaaccacta cagcagaag     1080
agcctctccc tgtctccggg taaatga                                           1107

```

<210> 19
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 19

10

Gly Arg Gly Glu Ala Glu
 1 5

<210> 20
 <211> 344
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético
 <400> 20

20

ES 2 613 523 T3

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

ES 2 613 523 T3

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

	<210>	21
	<211>	4
	<212>	PRT
5	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400>	21
	Thr Gly Gly Gly 1	
10		
	<210>	22
	<211>	5
	<212>	PRT
15	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400>	22
	Thr Gly Gly Gly Gly 1 5	
20		
	<210>	23
	<211>	4
	<212>	PRT
25	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400>	23
	Ser Gly Gly Gly 1	
30		
	<210>	24
	<211>	5
	<212>	PRT
35	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400>	24
	Ser Gly Gly Gly Gly 1 5	
40		
	<210>	25
	<211>	6
	<212>	PRT
45	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Descripción de secuencia artificial: marcaje 6xHis sintético
	<400>	25

ES 2 613 523 T3

His His His His His His
1 5

<210> 26
<211> 150
5 <212> PRT
<213> *Rattus sp.*
<400> 26

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

10
<210> 27
<211> 150
<212> PRT
<213> *Sus sp.*
15 <400> 27

ES 2 613 523 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145           150

```

```

<210> 28
<211> 150
5 <212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 28

```

ES 2 613 523 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 29
<211> 150
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 29

ES 2 613 523 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu 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>
 <211>
 5 <212>
 <213>
 <220>
 <223>
 <400>

30
 150
 PRT
 Desconocido
 Descripción de desconocido: polipéptido de ActRIIb bovino
 30

10

ES 2 613 523 T3

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

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

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

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

Pro Val Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 31
<211> 150
5 <212> PRT
<213> *Xenopus sp.*
<400> 31

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

ES 2 613 523 T3

```

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

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

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

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

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

Ile Val Gly Leu Ser Met
145                            150

```

```

<210> 32
<211> 150
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

```



```

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

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
          35          40          45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
          50          55          60

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

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
          85          90          95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
          100          105          110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
          115          120          125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
          130          135          140

Val Pro Leu Met Leu Ile
          145          150

```

- <210> 33
- <211> 154
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido de consenso sintético
- <220>
- 10 <221> variante
- <222> (8)..(8)
- <223> puede ser Ala
- <220>
- <221> variante
- 15 <222> (121)..(121)
- <223> puede ser Ala, Val o Met
- <400> 33

ES 2 613 523 T3

```

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

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

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

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

Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr 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 Val Ala Thr Glu
          85          90          95

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

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

Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
          130          135          140

Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
145          150

```

```

<210> 34
<211> 116
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34

```

ES 2 613 523 T3

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> 35
<211> 115
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 35

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

ES 2 613 523 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión ActRIIb-Fc para uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con hueso o un trastorno relacionado con músculo en un paciente, en la que la proteína de fusión ActRIIb-Fc es para administración al paciente con un plan de dosificación que mantenga una concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc de 8-20 µg/ml.
2. Uso de una proteína de fusión ActRIIb-Fc en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con hueso o un trastorno relacionado con músculo en un paciente, en el que la proteína de fusión ActRIIb-Fc es para administración al paciente con un plan de dosificación que mantenga una concentración sérica de proteína de fusión ActRIIb-Fc de 8-20 µg/ml.
3. La proteína de fusión para uso según la reivindicación 1, o el uso según la reivindicación 2, en los que la concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc se mantiene a una concentración de:
 - a. al menos 10 µg/ml; o
 - b. al menos 12 µg/ml.
4. La proteína de fusión para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en los que el plan de dosificación implica administrar
 - a. al menos 0,3 mg/kg;
 - b. al menos 1 mg/kg;
 - c. 2 mg/kg; o
 - d. 1 mg/kg
 de la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente.
5. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en los que el plan de dosificación implica administrar la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente
 - a. una vez cada 5-30 días;
 - b. una vez cada 10-16 días; o
 - c. una vez cada 14 días.
6. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en los que el plan de dosificación implica administrar 1 mg/kg de la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente una vez cada 14 días.
7. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en los que la proteína de fusión ActRIIb-Fc se selecciona del grupo consistente en:
 - a. un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, 3 o 13;
 - b. un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, 3 o 13;
 - c. un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2, 3 o 13;
 - d. un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2;
 - e. un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 90 % idéntica a una porción de ActRIIb, en el que el extremo N corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 19-25 de la SEQ ID NO: 1 y el extremo C corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1;
 - f. un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 95 % idéntica a una porción de ActRIIb, en el que el extremo N corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 19-25 de la SEQ ID NO: 1 y el extremo C corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1; y
 - g. un polipéptido que comprende una porción de ActRIIb, en el que el extremo N corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 19-25 de la SEQ ID NO: 1 y el extremo C corresponde a un residuo aminoacídico seleccionado de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1.
8. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en los que dicha proteína de fusión ActRIIb-Fc incluye uno o más residuos aminoacídicos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, 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 derivatizador orgánico.

9. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en los que la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 3.

10. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en los que la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2.

11. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en los que la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 13.

12. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 11, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en los que la proteína de fusión ActRIIb-Fc tiene una semivida sérica de entre 10 y 16 días en seres humanos normales sanos.

13. La proteína de fusión para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 12, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en los que la proteína de fusión ActRIIb-Fc se une a una o más de activina A, activina AB, activina B, GDF11 y GDF8.

		10	20	30	40	50																											
Rata	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Cerdo	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Ratón	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Ser humano	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Bovino	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Xenopus	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Ser humano	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R
Consenso	M	A	A	A	L	L	L	G	L	C	A	G	G	G	A	A	R	C	I	A	A	L	R	T	G	G	L	R	C	G	G	R	R

		80	72	80	88	96	104	112																									
Rata	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Cerdo	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Ratón	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Ser humano	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Bovino	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Xenopus	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Ser humano	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R
Consenso	L	H	C	A	R	H	G	I	L	V	K	G	C	L	I	N	C	R	C	G	V	A	I	I	P	V	G	C	G	H	C	H	R

		125	133	141	149																			
Rata	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Cerdo	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Ratón	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Ser humano	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Bovino	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Xenopus	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Ser humano	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-
Consenso	H	L	A	G	G	V	T	A	P	P	A	P	L	L	V	L	A	L	L	I	G	G	L	-

Figura 1

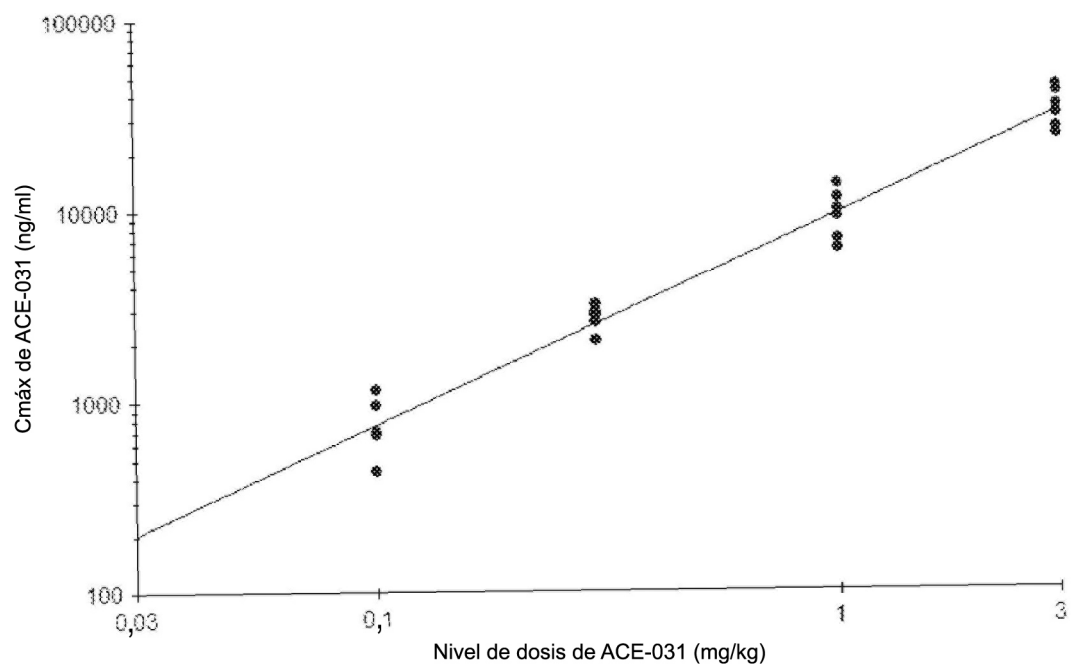


Figura 2

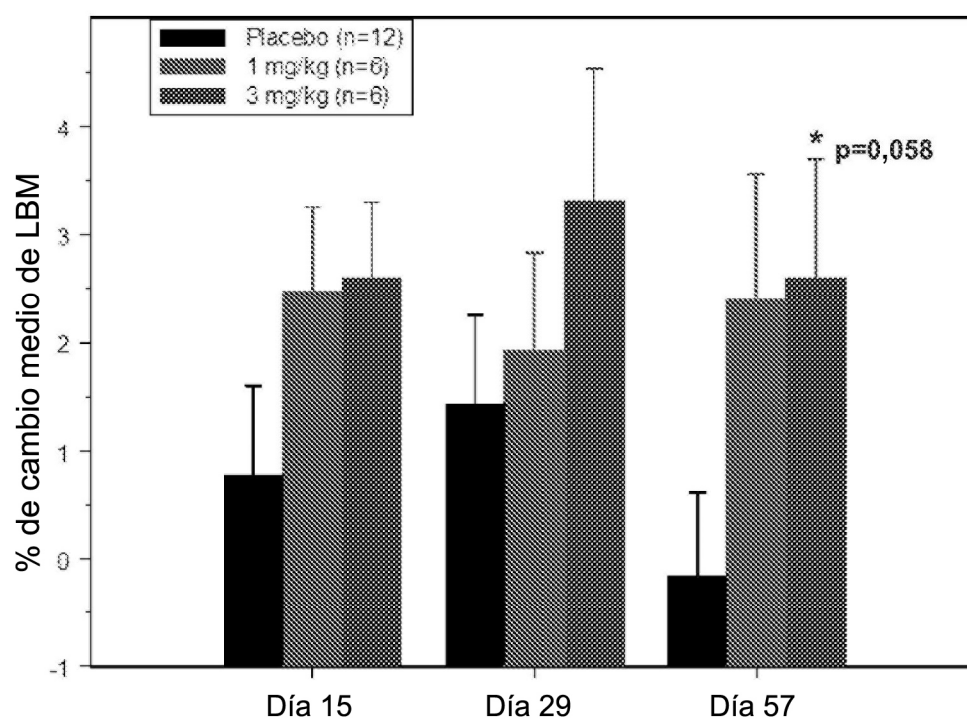


Figura 3

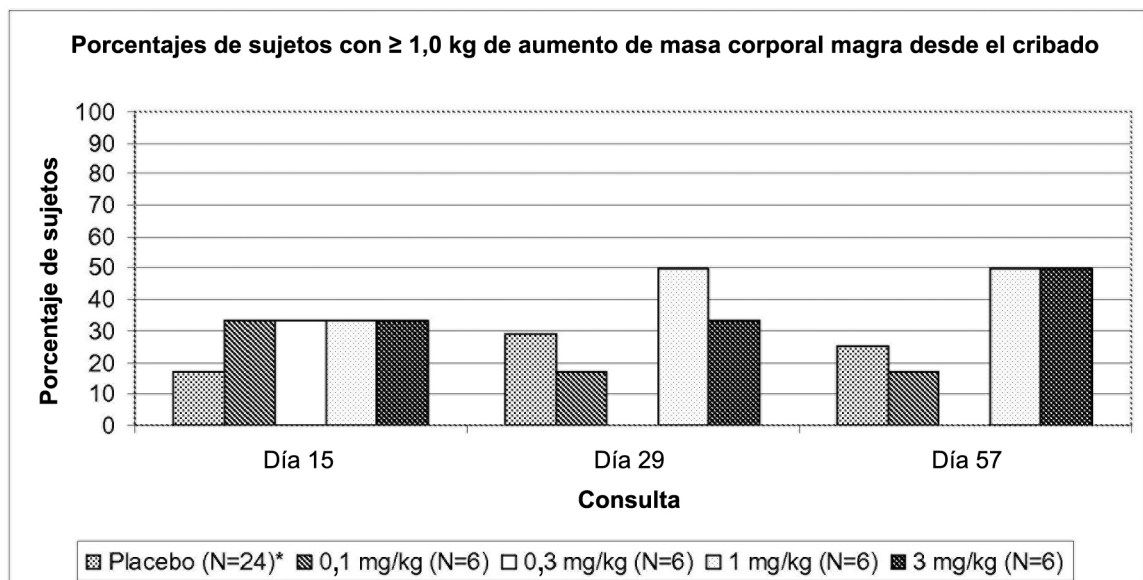
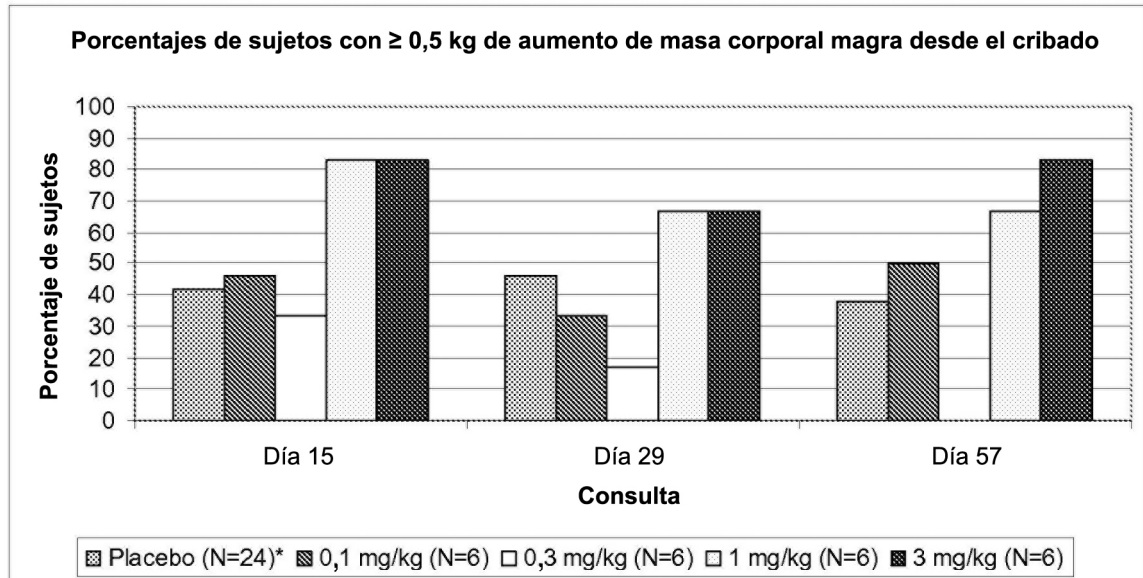


Figura 4

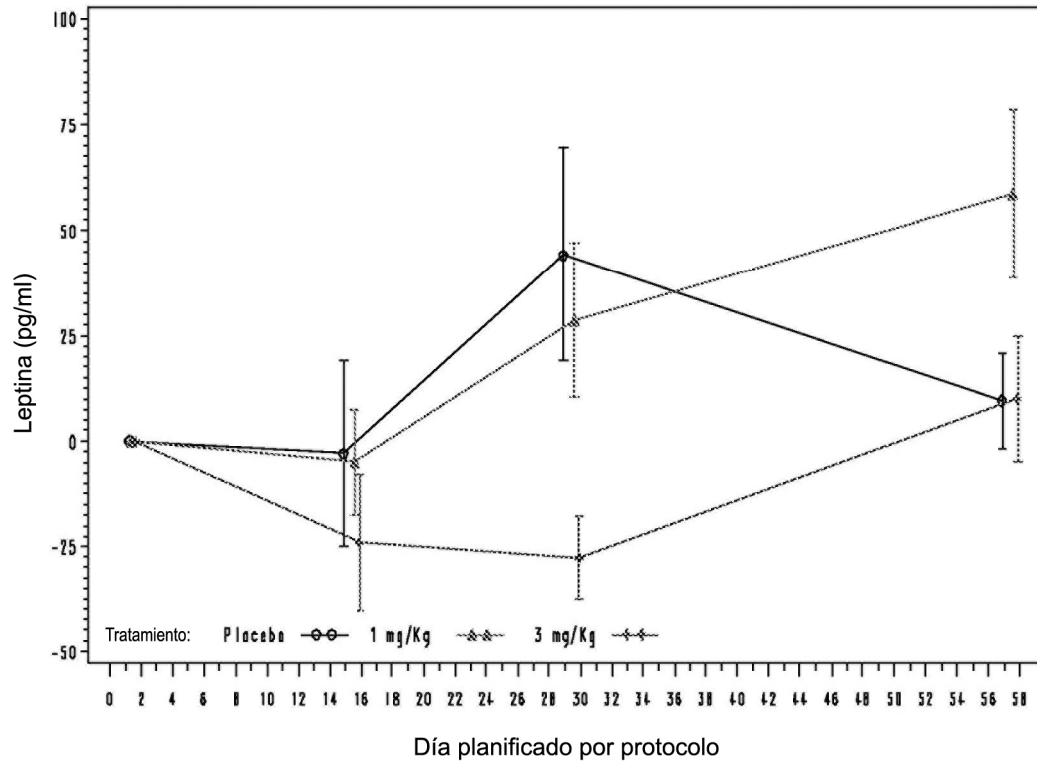


Figura 5

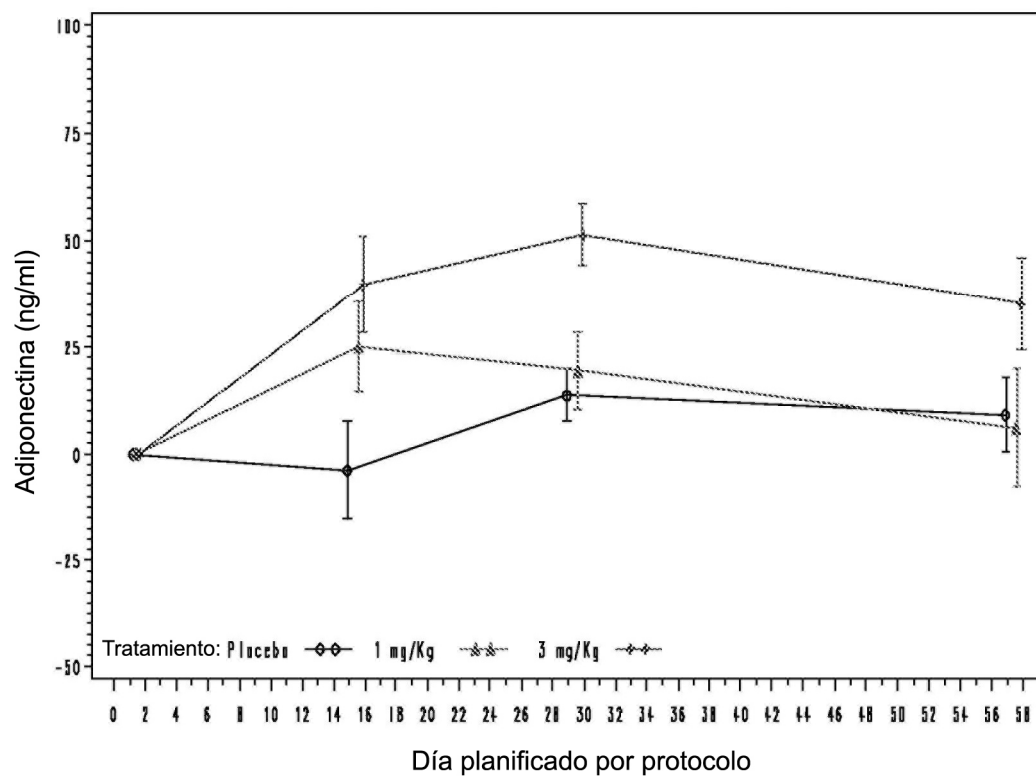


Figura 6

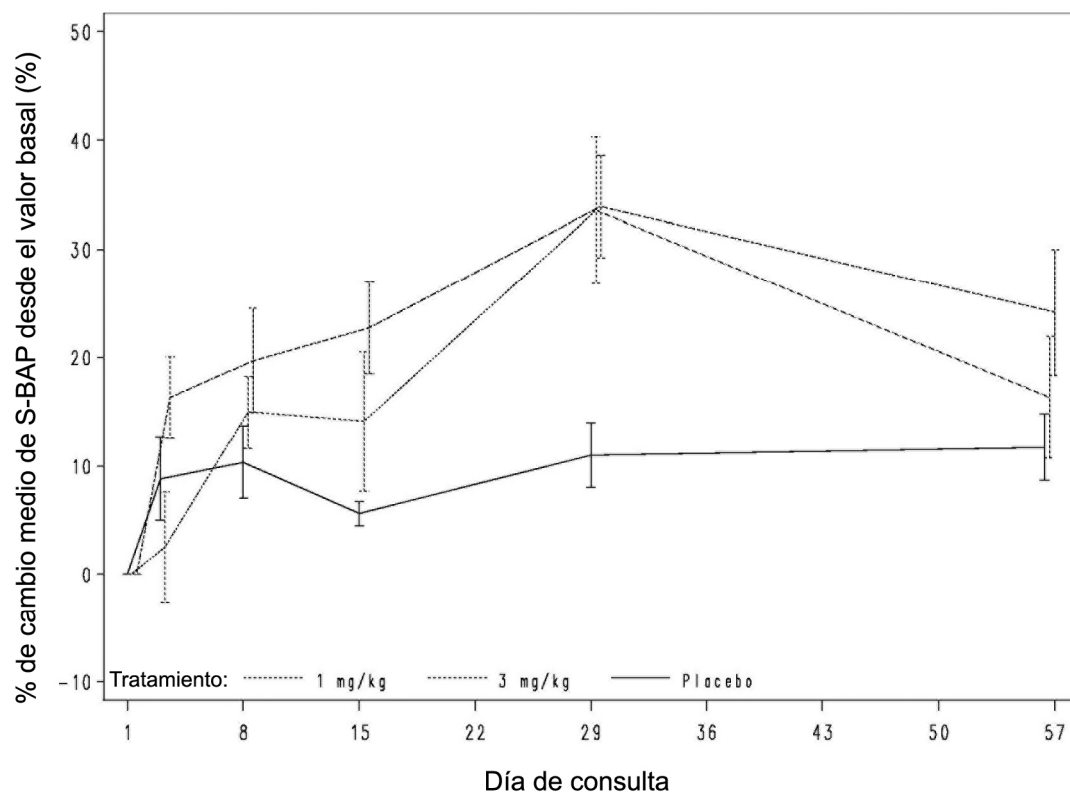


Figura 7

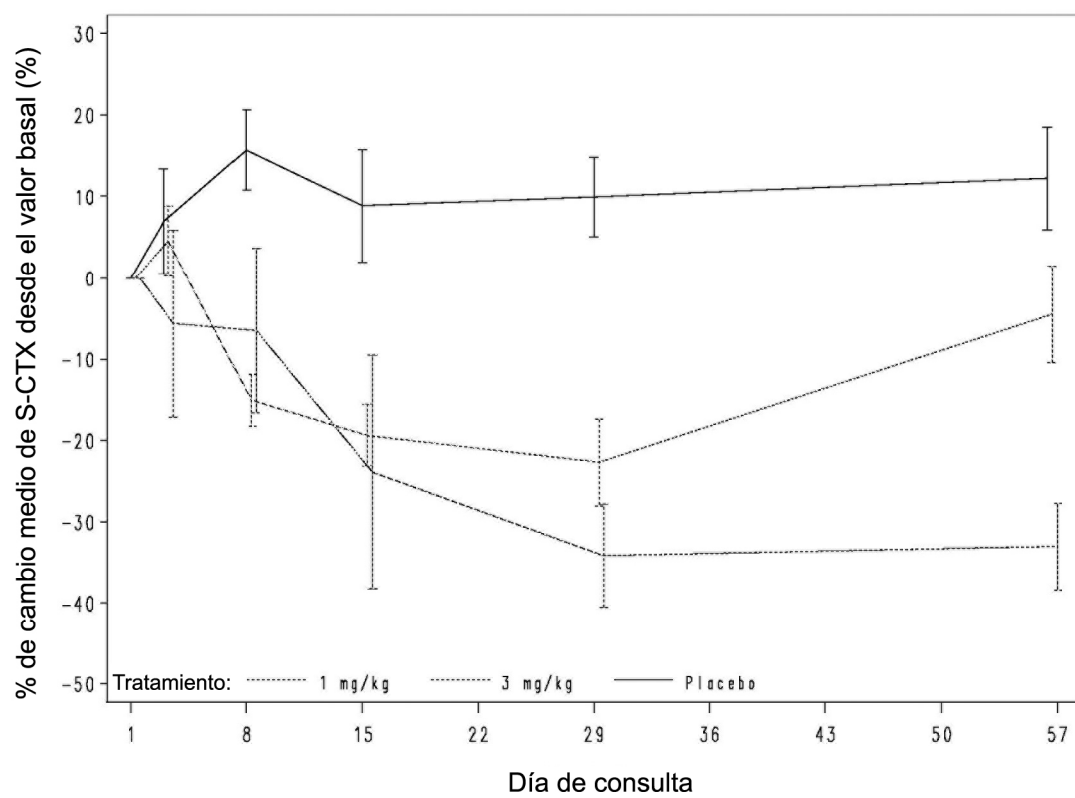


Figura 8

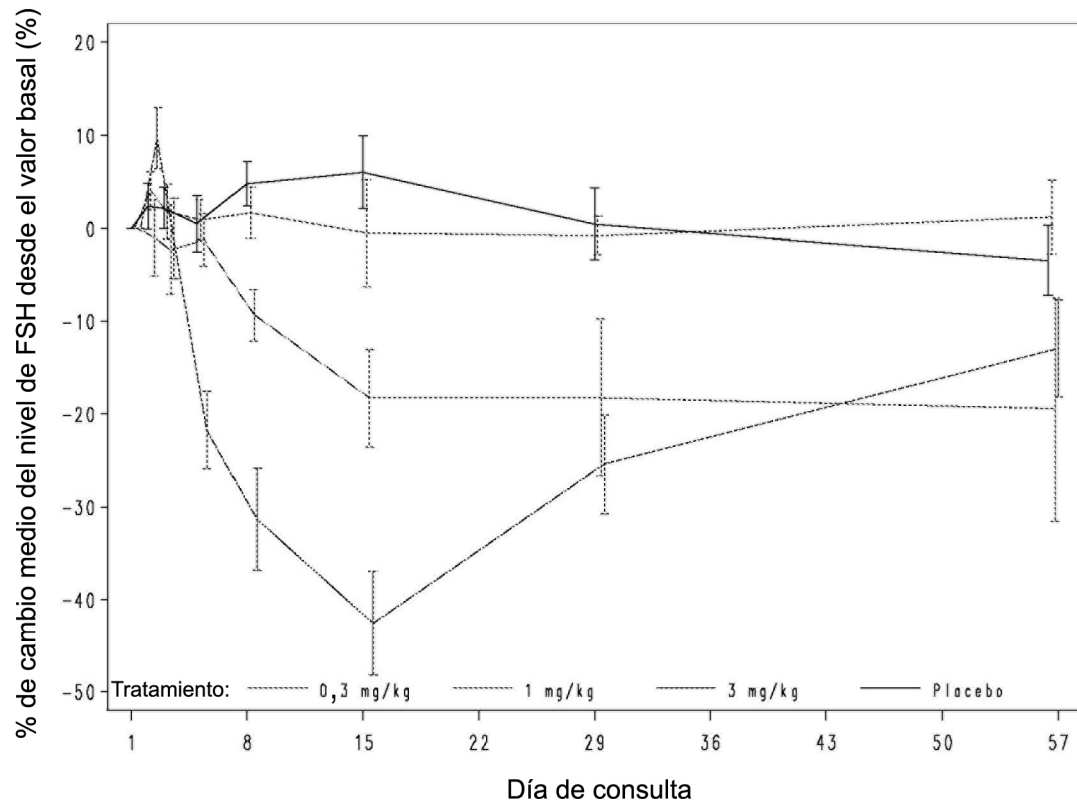


Figura 9

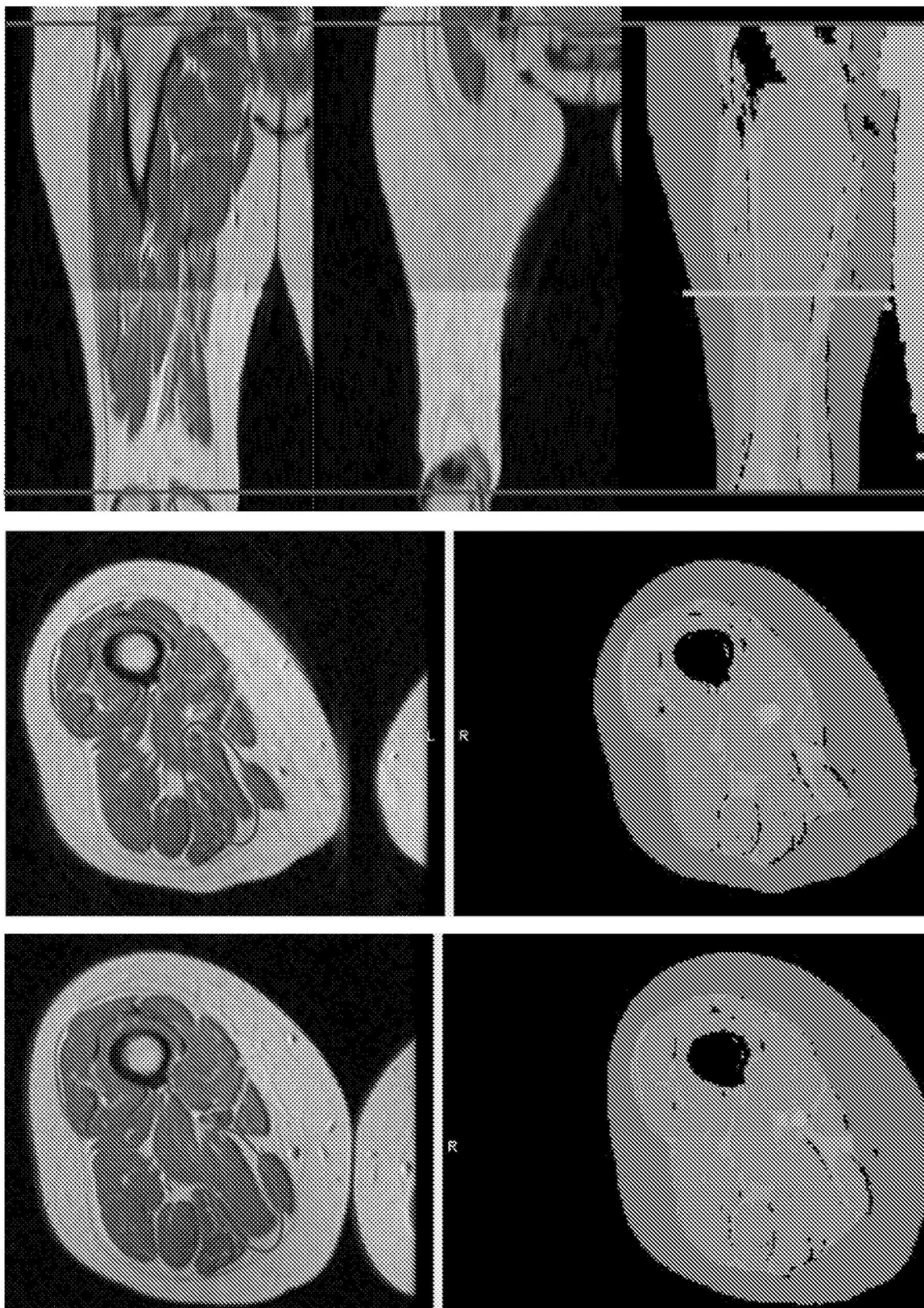


Figura 10

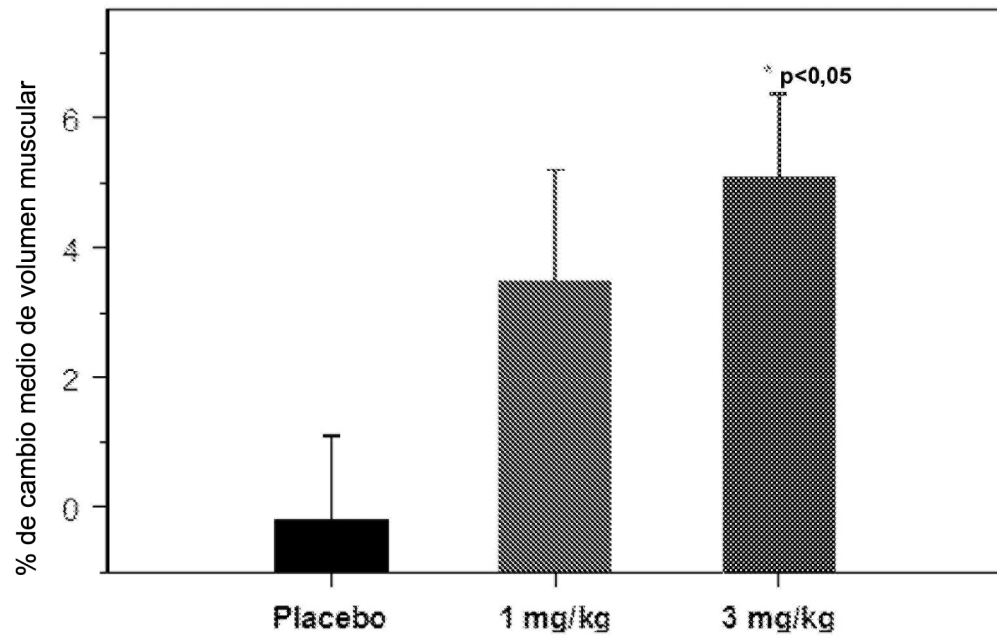


Figura 11

ActRIIb (residuos 1-134 de SEQ ID NO: 1 (precursor) y SEQ ID NO: 2 (extracelular):

```

              10      20      30      40      50      60
1-134 de SEQ 1  MTAPWVALALLWGLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCY 60
SEQ 2          -----GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCY 41
                      *****
                      1      11      21      31      41

              70      80      90      100     110     120
1-134 de SEQ 1  ASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG 120
SEQ 2          ASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG 101
                      *****
                      51      61      71      81      91     101

              130
1-134 de SEQ 1  GPEVTYEPPTAPT 134
SEQ 2          GPEVTYEPPTAPT 115
                      *****
                      111

```

Figura 12

ActRIIa	ILGRSETQEC	IEENANWEKD	RTNQTGV ¹ EEPC	YGD ² KDKRRRC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTN ³ QSGLERC	EGE ⁴ QDKRLHC	YASWRN ⁵ SSGT

IEIVK ⁶ QGCWL	DDINCY ⁷ RTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP ⁸ EM
IELVKKGCWL	DDFN ⁹ CYDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA

EVTQPTSNFV	TPKPPT
GGPEVTYEPP	PTAPT

Figura 13

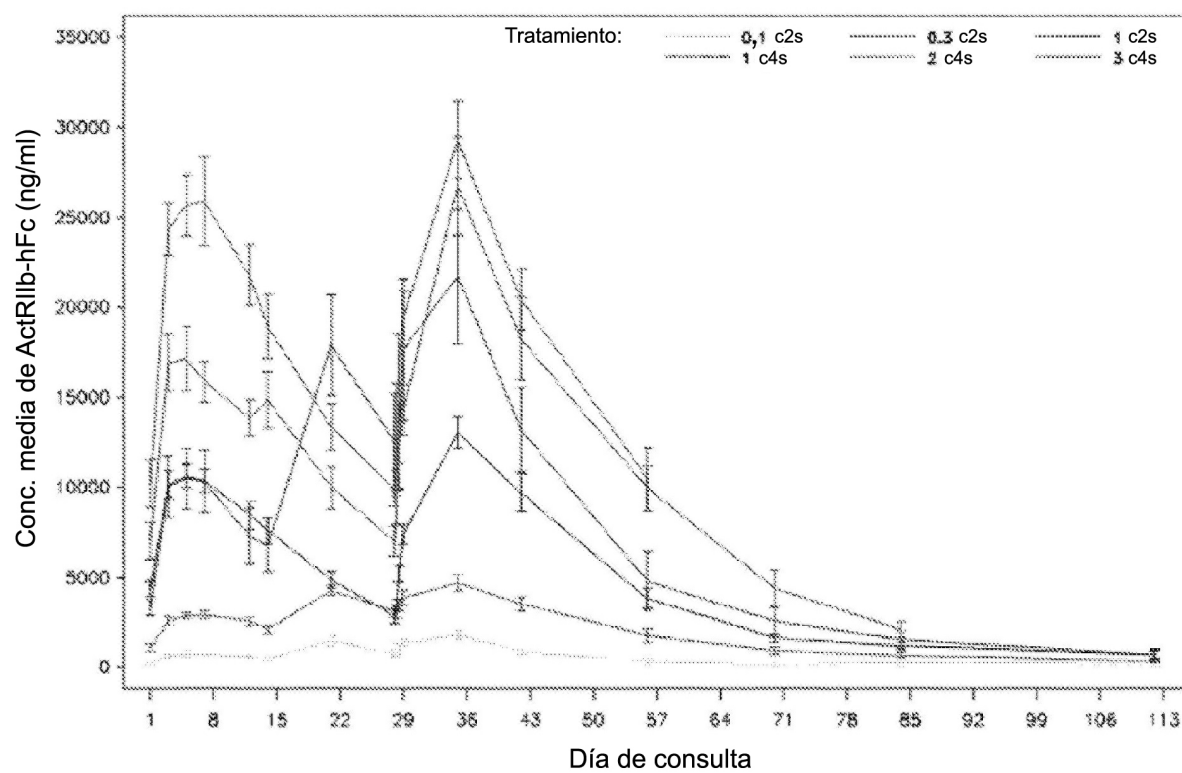


Figura 14

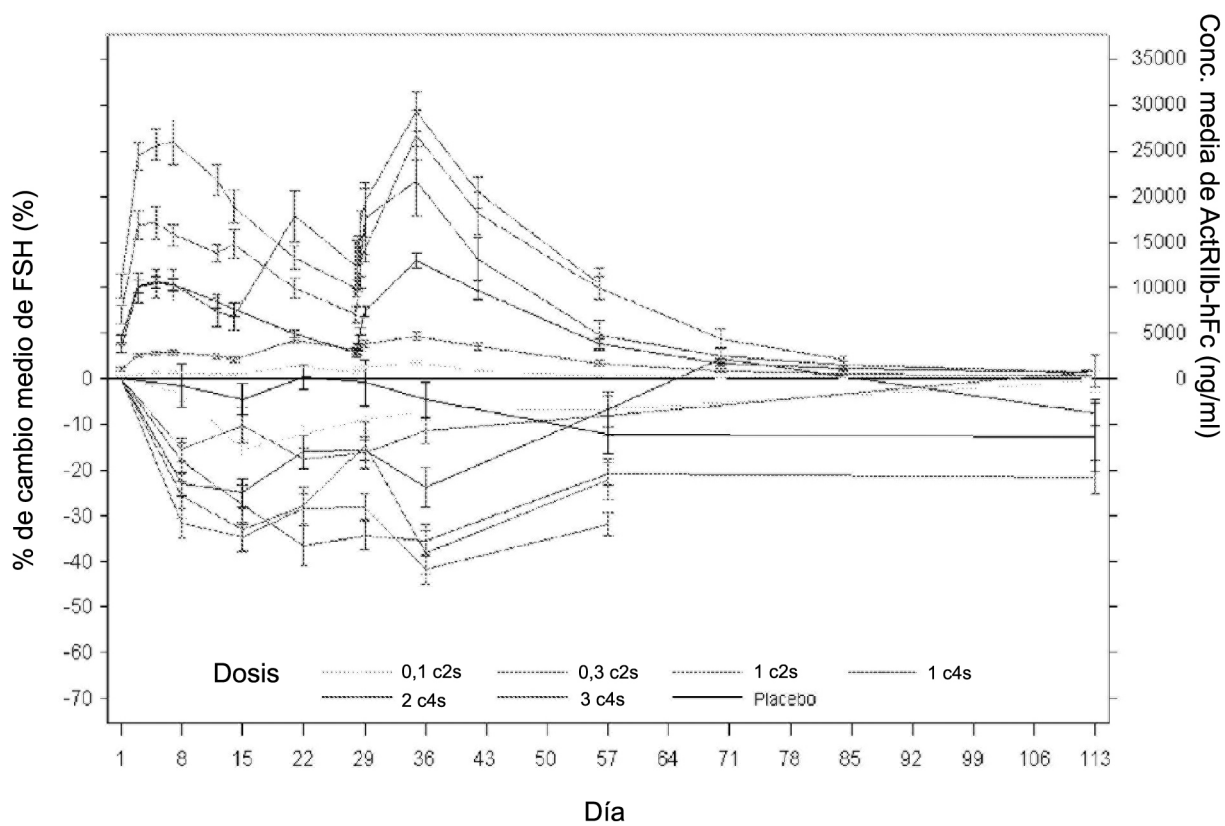


Figura 15

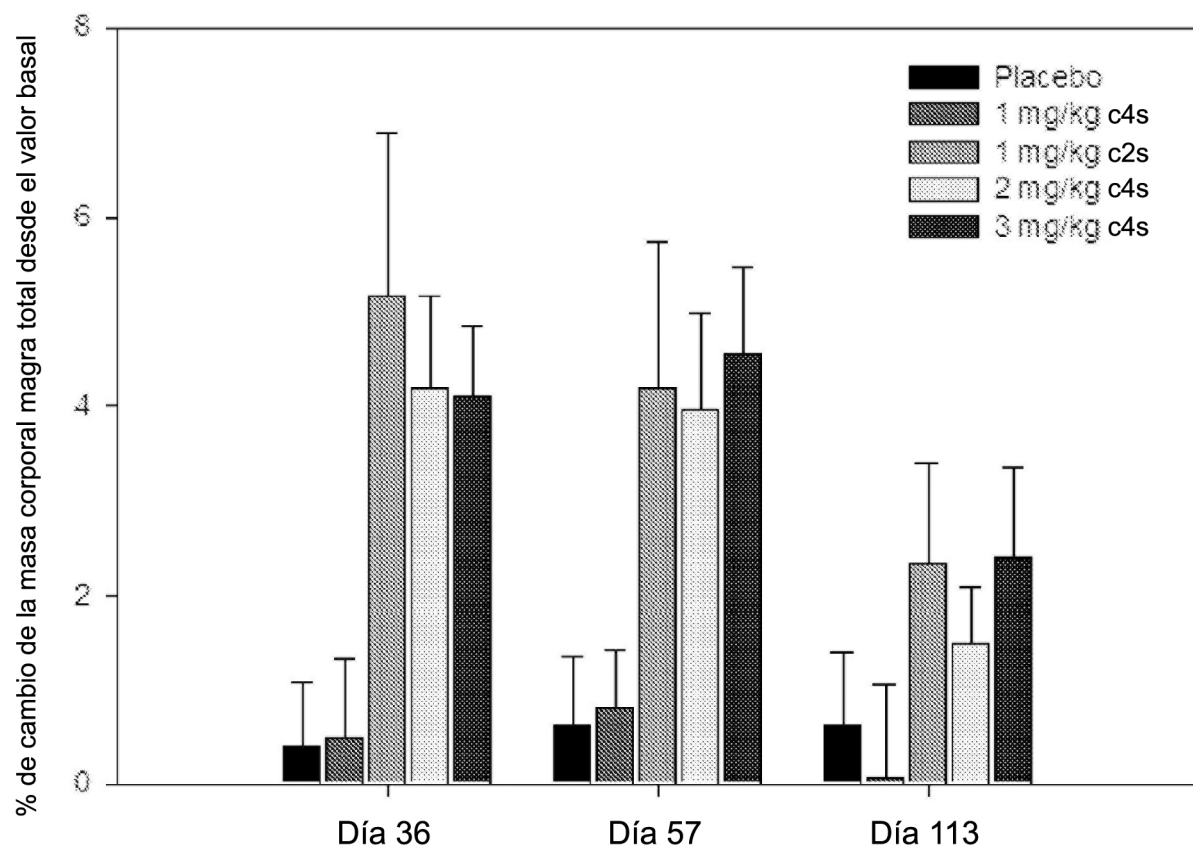


Figura 16