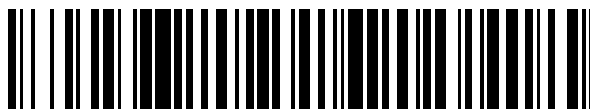


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 292**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2010** **PCT/US2010/057074**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011** **WO11063018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2010** **E 10832122 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2501400**

54 Título: **Proteínas ActRIIB y variantes y usos de las mismas con respecto a la inducción de la utrofina para el tratamiento de la distrofia muscular**

30 Prioridad:

**26.03.2010 US 318126 P**

**17.11.2009 US 281386 P**

**05.05.2010 US 331686 P**

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

**09.03.2018**

73 Titular/es:

**ACCELERON PHARMA, INC. (100.0%)**

**149 Sidney Street**

**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SEEHRA, JASBIR y**

**LACHEY, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 658 292 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

Proteínas ActRIIB y variantes y usos de las mismas con respecto a la inducción de la utrofina para el tratamiento de la distrofia muscular

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética que resulta de una variedad de diferentes mutaciones en el gen que codifica la distrofina. La distrofina es una proteína citoesquelética grande que proporciona integridad estructural a las fibras musculares de contracción. Los pacientes con DMD producen poca o ninguna distrofina funcional, lo que da lugar a la fragilidad de las membranas de sarcolema que rodean cada fibra muscular. Como consecuencia de esta fragilidad, los pacientes con DMD presentan degeneración progresiva de los músculos esqueléticos y cardíacos, con inicio típicamente a la edad de dos a seis años. La enfermedad causa debilidad generalizada y pérdida de masa muscular. La supervivencia es poco común más allá de los 30 años de edad.

[0002] En una afección relacionada y algo más suave, la distrofia muscular de Becker (BMD), el paciente produce algo de distrofina funcional, pero no lo suficiente para proporcionar durabilidad y mantenimiento normal del tejido muscular. Los pacientes con DMO suelen tener una vida útil más larga que los pacientes con DMD.

[0003] Aunque la DMD y la BMD son actualmente enfermedades incurables, un enfoque terapéutico bajo investigación implica el tratamiento con agentes que aumentan los niveles de una proteína llamada utrofina. La utrofina es estructural y funcionalmente similar a la distrofina. Además, la utrofina está normalmente presente en las fibras musculares durante el desarrollo fetal y permanece en las fibras maduras en las uniones neuromusculares. A niveles suficientes y con la localización apropiada en el sarcolema, la utrofina muestra evidencias de compensar parcialmente la ausencia de distrofina en modelos animales de DMD.

[0004] Los pacientes con DMD y DMB tienen un gen de utrofina normal, y puede ser posible incrementar la fuerza de las fibras musculares en los pacientes mediante el aumento de la producción de utrofina.

[0005] Por lo tanto, hay una necesidad de agentes que aumenten la producción de utrofina y/o localización en el sarcolema de la utrofina.

### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0006] La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

[0007] En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para aumentar la expresión y/o localización de utrofina en la membrana celular (sarcolema) de fibras musculares en los pacientes con DMD y la BMD mediante el uso de antagonistas de la ruta de señalización de ActRIIB. Dichos antagonistas pueden ser, por ejemplo, proteínas ActRIIB solubles (por ejemplo, proteínas de fusión ActRIIB-Fc), antagonistas que se unen a ActRIIB o inhiben la expresión de ActRIIB, y antagonistas que se unen o inhiben la expresión de ligandos que señalan a través de ActRIIB y participan en la regulación de la expresión de la utrofina en el músculo esquelético o cardíaco. Tales ligandos incluyen miostatina, GDF3, activinas, BMP7, BMP2 y BMP4. En particular, la descripción demuestra que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc aumentan la expresión en el sarcolema de la utrofina en un modelo de ratón de la distrofia muscular. Al aumentar la resistencia del sarcolema al daño, los antagonistas de la ruta de señalización de ActRIIB pueden disminuir el ciclo de la lesión, inflamación y degradación muscular que es el sello de las afecciones deficientes en distrofina, tales como DMD y la BMD. Estos efectos beneficiosos se combinan con los efectos pronunciados de antagonistas de ActRIIB sobre la masa muscular y fuerza general. Como consecuencia, la descripción proporciona un cambio de paradigma para el uso de antagonistas de la ruta de ActRIIB en el tratamiento de trastornos musculares, pasando de un paradigma que hace hincapié en el aumento de tamaño y la fuerza de la fibra muscular a un paradigma que reconoce un incremento en la integridad de la fibra muscular, una característica que es particularmente relevante en las distrofias musculares. Una consecuencia de la fragilidad muscular en pacientes con distrofia muscular es un aumento en los marcadores séricos de la degeneración muscular, como la creatina quinasa (particularmente la isoforma MM, también referido como CK-MM). Los datos proporcionados en este documento indican que los antagonistas de la ruta de ActRIIB pueden aumentar la integridad de la fibra muscular y por lo tanto disminuir el nivel de marcadores séricos, tales como CK-MM. Por lo tanto, los marcadores de la degeneración muscular, tales como los niveles séricos de CK-MM, se pueden utilizar como mecanismo para el seguimiento de la eficacia de dichas terapias en pacientes con DMD y BMD. Por ejemplo, el hecho de disminuir un marcador de la degeneración muscular se puede utilizar como un indicador para aumentar la dosis o terminar la dosis por falta de beneficio, y se puede utilizar la disminución satisfactoria de un marcador de la degeneración muscular como un indicador de que se ha logrado una dosis eficaz. Del mismo modo, un paciente con un marcador elevado de degeneración muscular puede ser un candidato particularmente apropiado para el tratamiento con antagonistas de ActRIIB. Como se

describe en Zatz et al. (J. Neurol Sci 1991 102 (2): 190-6), los niveles de CK alcanzan máximos en los pacientes con DMD y DMB durante un período de tiempo de máxima degeneración muscular (típicamente en un rango de edad de 1 a 6, 7, u 8 años de edad en DMD y de 10 a 15 años de edad en BMD), y por lo tanto los pacientes con DMD y DMB con altos niveles de un marcador de la degeneración muscular (elevadas incluso en comparación con otros con el estado de enfermedad, por ejemplo, niveles séricos de CK-MM mayores del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de otros pacientes con dicha enfermedad) son pacientes particularmente apropiados para el tratamiento con antagonistas de ActRIIB, tales como proteínas ActRIIB-Fc.

**[0008]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para aumentar la expresión en el sarcolema de la utrofina mediante la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de un polipéptido relacionado con ActRIIB. Un polipéptido relacionado con ActRIIB puede ser un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio extracelular de ActRIIB o parte del mismo) que se une a un ligando de ActRIIB, tal como GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, GDF8, GDF11, activina o nodal. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIB se une a un ligando de ActRIIB con una Kd de menos de 10 micromolar o menos que 1 micromolar, 100, 10 o 1 nanomolar. Una variedad de polipéptidos ActRIIB adecuados han sido descritos en las siguientes solicitudes de patente PCT publicadas, WO 00/43781, WO 04/039948, WO 06/012627, WO 07/053775, WO 08/097541, y WO 08/109167. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIB inhibe la señalización ActRIIB, tales como eventos de transducción de señales intracelulares activadas por un ligando de ActRIIB. Un polipéptido ActRIIB soluble para su uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 1, 2, 5, 12, y 23, o que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, 2, 5, 12, y 23. Un polipéptido ActRIIB soluble puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1, 2, 5, 12, y 23, o una secuencia de SEQ ID NO: 1, que carece de 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 aminoácidos C-terminales y que carece de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo N-terminal. Opcionalmente, los polipéptidos comprenderán un truncamiento con respecto a la SEQ ID NO: 1 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N-terminal y no más de 3 aminoácidos en el extremo C-terminal. Otro polipéptido es el que presenta como SEQ ID NO: 12. Un polipéptido ActRIIB soluble puede incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) con relación a un polipéptido ActRIIB natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula eucariota de mamífero, de insecto o de otro tipo o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con respecto al polipéptido ActRIIB de origen natural. Un polipéptido ActRIIB soluble puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB o una variante del mismo) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tales como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, direccionamiento a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de la estabilidad in vivo, la vida media, la absorción/administración, localización o distribución en tejido, la formación de complejos de proteínas, multimerización de la proteína de fusión, y/o purificación. Una proteína de fusión ActRIIB soluble puede incluir un dominio constante de inmunoglobulina, tal como un dominio Fc (de tipo natural o mutante) o una albúmina de suero. En ciertos casos, una fusión ActRIIB-Fc comprende un enlazador relativamente poco estructurado situado entre el dominio Fc y el dominio de ActRIIB extracelular. Este enlazador no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de la estructura secundaria. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetitivas o no repetitivas de treonina/serina y/o glicinas (por ejemplo, TG<sub>4</sub>, TG<sub>3</sub>, SG<sub>4</sub>, SG<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>2</sub>, G). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta epitópica, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina, y una fusión GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB soluble incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico, y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. En general, es preferible que una proteína ActRIIB pueda expresarse en una línea celular de mamífero que media la glicosilación adecuada natural de la proteína ActRIIB a fin de disminuir el apoyo de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Las líneas celulares humanas y CHO han sido utilizados con éxito, y se espera que otros vectores de expresión de mamíferos comunes sean útiles.

**[0009]** En ciertos aspectos, un compuesto descrito en el presente documento pueden formularse como una preparación farmacéutica. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se utiliza para tratar un trastorno asociado con ActRIIB. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos.

**[0010]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIB soluble, que no codifican un polipéptido ActRIIB completa. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido ActRIIB soluble, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir

una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un ActRIIB y una secuencia que codificaría una parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRIIB, pero para un codón de parada situado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótido de ActRIIB de longitud completa, tal como SEQ ID NO: 4 (Figura 4), o una versión parcialmente truncada, comprendiendo dicho polinucleótido aislado además un codón de terminación de la transcripción de al menos seiscientos de nucleótidos antes el extremo 3' o posicionado de otra manera tal que la traducción del polinucleótido da lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una parte truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden unirse operativamente a un promotor para la expresión, y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

**[0011]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para fabricar un polipéptido ActRIIB soluble. Dicho procedimiento puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) descritos en este documento 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 ActRIIB soluble, en el que dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActRIIB soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRIIB soluble así expresado. Los polipéptidos ActRIIB solubles pueden ser recuperados como crudo, parcialmente purificados o fracciones altamente purificadas utilizando cualquiera de las técnicas bien conocidas para la obtención de proteínas a partir de cultivos de células.

**[0012]** En ciertos aspectos, el aumento de la expresión en el sarcolema de utrofina usando un compuesto descrito en este documento puede ser útil en el tratamiento de distrofias musculares, en el que la proteína distrofina está ausente, es deficiente, o defectuosa. Los ejemplos incluyen el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de Becker.

**[0013]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para antagonizar la actividad de un polipéptido ActRIIB o un ligando de ActRIIB (por ejemplo, GDF8, GDF11, activina, BMP-7, y Nodal) en una célula. Los procedimientos comprenden poner en contacto la célula con un polipéptido ActRIIB soluble. Opcionalmente, la actividad del polipéptido ActRIIB o el ligando de ActRIIB está controlada por una transducción de la señalización mediada por el complejo de ligando ActRIIB/ActRIIB, por ejemplo, mediante el control de la proliferación celular, hipertrofia, o el nivel de la expresión de utrofina o localización de la utrofina. Las células de los procedimientos incluyen un miocito y una célula muscular.

**[0014]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona usos de un polipéptido ActRIIB soluble para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección, tal como se describe en el presente documento.

**[0015]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para aumentar la expresión en el sarcolema de la utrofina en un paciente en necesidad de la misma, y dicho procedimiento puede comprender administrar una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2 y un polipéptido codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 (figura 3). El polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende una parte heteróloga. El polipéptido puede ser un dímero. El polipéptido puede fusionarse a un dominio constante de una inmunoglobulina. El polipéptido puede fusionarse a una parte Fc de una inmunoglobulina, tal como una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109, 29-128, 29-131, 29-134, 25-109, 25-128, 25-131, 25-134 o 20-134 de la SEQ ID NO: 2 (Figura 2). El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 12, o 23. Un paciente que va a tratarse con dicho compuesto puede ser aquel que tenga un trastorno descrito en la presente memoria, incluyendo, por ejemplo, una distrofia muscular.

**[0016]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para aumentar la expresión en el sarcolema de la utrofina en un paciente en necesidad de la misma, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la vía de señalización de ActRIIB, ya sea mediante el direccionamiento de ActRIIB o un ligando que señala a través de ActRIIB. Ejemplos de tales compuestos incluyen antagonistas de ActRIIB; antagonistas de miostatina; antagonistas de BMP7; antagonistas de BMP2; antagonistas de BMP4 y antagonistas de GDF3. Los antagonistas de cada uno de los anteriores puede ser un anticuerpo u otra proteína que se une específicamente e inhibe dicha diana (por ejemplo, un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal, o un propéptido en el caso de la miostatina y GDF3). Los antagonistas de los anteriores también pueden ser un compuesto, tal como un compuesto a base de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido o ácido nucleico ARNi), que inhiben la expresión de ActRIIB o el ligando. Un paciente a ser tratado con dicho compuesto puede ser aquel que tenga un trastorno descrito en la presente

memoria, incluyendo, por ejemplo, una distrofia muscular.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 **[0017]** El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de solicitud de patente o patente con el dibujo o dibujos en color serán proporcionadas por la Oficina bajo petición y pago de la tasa necesaria.
- La figura 1 muestra una secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) (SEQ ID NO: 1). La "cola" C-terminal está subrayada.
- 10 La figura 2 muestra la secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2). El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en negrita (también denominado como SEQ ID NO: 1); y los sitios potenciales de glicosilación unidos a N están en recuadros.
- La figura 3 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular), designado como SEQ ID NO: 3.
- 15 La figura 4 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEQ ID NO: 4.
- La figura 5 muestra un alineamiento de ActRIIA humana (SEQ ID NO: 14) y ActRIIB con los residuos que se deducen en el presente documento, basado en el análisis de material compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA en contacto directamente con ligando (el bolsillo de unión a ligando) indicado en recuadros.
- 20 La figura 6 muestra una alineación de secuencias múltiples de varias proteínas ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humanas (SEQ ID NOs: 15-22).
- La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos completa de ActRIIB (25-131)-hFc. El líder TPA (residuos 1-22) y dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos nativos 25-131) están cada uno subrayados. Se destaca que el glutamato revelado mediante la secuenciación es el aminoácido N-terminal de la proteína de fusión madura.
- 25 La figura 8 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB (25-131)-hFc (la cadena codificante se muestra en la parte superior y el complemento se muestra en la parte inferior 3'-5'). Las secuencias que codifican el líder TPA (nucleótidos 1-66) y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 73-396) están subrayadas. También se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente para ActRIIB (25-131).
- La figura 9 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc durante 20 semanas en los niveles de proteína utrofina en el músculo en un modelo de ratón *mdx* de distrofia muscular. A. Análisis de transferencia Western de la proteína utrofina en homogeneizados de músculo principal pectoral. B. Cuantificación densitométrica de bandas de utrofina que se muestran en A, normalizadas a proteína GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y se expresada en unidades relativas (RU). Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 5 ratones por grupo; \*, P < 0,05. El tratamiento crónico de ratones *mdx* de edad media con ActRIIB (20-134)-mFc aumentó los niveles de utrofina en el músculo pectoral en más de un 80%.
- 30 La figura 10 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc durante 20 semanas sobre la distribución de la utrofina en las fibras musculares en un modelo de ratón *mdx* de distrofia muscular. Se muestran secciones transversales a través del extensor largo de los dedos (EDL). Barra de escala, 50  $\mu$ m. El tratamiento con ActRIIB(20-134)-mFc aumentó ampliamente los niveles en sarcolema de la utrofina. A. Ratones *mdx* fueron tratados con vehículo. B. Ratones *mdx* fueron tratados con ActRIIB (20-134)-mFc.
- 35 La figura 11 muestra ampliaciones de la figura 10 para mayor claridad. Barra de escala, 50  $\mu$ m. A. Ratones *mdx* fueron tratados con vehículo. B. Ratones *mdx* fueron tratados con ActRIIB (20-134)-mFc.
- La figura 12 muestran el efecto de ActRIIB (20-134)-mFc sobre los niveles de creatina quinasa en suero. A. muestra el diseño experimental para el estudio descrito en el Ejemplo 7. B. El gráfico muestra los niveles séricos de creatina quinasa para cada uno de los cuatro grupos experimentales. El grupo 4 tenía estadísticamente menores niveles de creatina quinasa en suero que cada uno de los Grupos 1 a 3.
- 40
- 45

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### 1. Información general

- 50 **[0018]** La presente invención se refiere a polipéptidos ActRIIB. Tal como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas de receptores de activina tipo IIB (ActRIIB) y proteínas relacionadas con ActRIIB, derivado de cualquier especie. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente todas las proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático con una especificidad de serina/treonina quinasa predicha. Las secuencias de aminoácidos de proteína precursora de ActRIIA humana (SEQ ID NO: 14, proporcionada para la comparación) y la proteína precursora de ActRIIB se ilustran en la Figura 5.
- 55
- [0019]** El término "polipéptido ActRIIB" se utiliza para referirse a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como las variantes de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones, y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB
- 60

incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tiene una secuencia de al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIB, y preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o mayor identidad.

**[0020]** En una realización específica, la invención se refiere a polipéptidos ActRIIB solubles. Como se describe en el presente documento, el término "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere en general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. El término "polipéptido ActRIIB soluble" como se usa en el presente documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIB, así como las variantes de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y es generalmente soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles incluyen polipéptidos ActRIIB solubles ilustrados en la figura 1 (SEQ ID NO: 1). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia señal, además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB (véase el Ejemplo 1). La secuencia señal puede ser una secuencia nativa de señal de un ActRIIB, o una secuencia señal de otra proteína, tal como una secuencia señal de activador del plasminógeno tisular (TPA) o una secuencia señal de melitina de abejas melíferas (HBM).

**[0021]** Las señales de TGF- $\beta$  están mediadas por complejos heterómeros de receptores de serina/treonina tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad aguas abajo tras la estimulación de ligando (Massagué, 2000, Nat Rev. Mol Cell Biol 1: 169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son todas proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización; y se requieren los receptores de tipo II para ligandos de unión y para la expresión de los receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión a ligando, lo que resulta en la fosforilación de receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

**[0022]** Se han identificado dos receptores tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell. 65: 973-982; Attisano et al, 1992, Cell 68: 97-108). Además de activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo BMP7, Nodal, GDF8, y GDF-11 (Yamashita et al, 1995, J. Cell Biol. 130: 217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc Natl Acad Sci. 98: 9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol Cell. 7: 949-957; Oh et al, 2002, Genes Dev 16: 2749-54). Los solicitantes han encontrado que las proteínas de fusión ActRIIA-Fc solubles y proteínas de fusión ActRIIB-Fc tienen sustancialmente diferentes efectos in vivo, teniendo ActRIIA-Fc efectos primarios sobre el hueso y teniendo ActRIIB-Fc efectos primarios sobre el músculo esquelético.

**[0023]** En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a antagonizar un ligando de los receptores de ActRIIB (también denominado como ligando de ActRIIB) con un polipéptido ActRIIB objeto (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB soluble). Así, las composiciones y procedimientos de la presente descripción son útiles para tratar trastornos asociados con la actividad anormal de uno o más ligandos de receptores de ActRIIB. Los ejemplos de ligandos de receptores de ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia TGF- $\beta$ , tales como activina, Nodal, GDF8, GDF-11, y BMP7.

**[0024]** Las activinas son factores de crecimiento de polipéptidos diméricos y pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Hay tres activinas (A, B, y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades  $\beta$  estrechamente relacionadas ( $\beta\alpha\beta$ A,  $\beta\beta\beta$ B, y  $\beta\alpha\beta$ B). En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células de ovario y de placenta, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular positiva o negativamente, dependiendo del tipo de célula, e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios (DePaolo et al, 1991, Proc SocEp Biol Med 198: 500-512; Dyson et al, 1997, CurrBiol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol 55: 953-963.). Además, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata et al, 1988, PNAS, 85: 2434). Se sugirió que la activina A actúa como un regulador natural de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y la síntesis de FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de activina y/o se unen a la activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP),  $\alpha_2$ -macroglobulina, Cerberus, y endogлина, que se describen a continuación.

**[0025]** Las proteínas nodales tienen funciones en la inducción y formación de mesodermo y endodermo, así como la posterior organización de las estructuras axiales, tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la notocorda y la placa de pre-cordal, mientras que recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar a través de los receptores tipo I y tipo II y efectores intracelulares

conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma et al, Genes Cells 2002, 7: 401-12). Se sugiere que los ligandos nodales interactúan con sus cofactores (por ejemplo, crypto) para activar los receptores de activina de tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas nodales están implicadas en muchos eventos críticos para el embrión de vertebrados tempranos, incluyendo la formación de mesodermo, patrón anterior, y la especificación del eje izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización de Nodal activa Par3-Lux, un indicador de luciferasa previamente demostrada que responde específicamente a la activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir pTlx2-Lux, un reportero específicamente sensible a proteínas morfogenéticas óseas. Resultados recientes proporcionan evidencia bioquímica directa que la señalización de nodal está mediada por ambos la vía de activina-TGF-beta, Smads, Smad2 y Smad3. Otra prueba ha demostrado que se requiere la proteína Cripto extracelular para la señalización de nodal, por lo que es distinta de la señalización de activina o la señalización de TGF-beta.

**[0026]** El factor-8 de crecimiento y diferenciación (GDF8) es también conocido como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. GDF8 es altamente expresado en el desarrollo y en el músculo esquelético adulto. La mutación nula de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron et al, Nature, 1997, 387: 83-90). Incrementos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones de origen natural de GDF8 en ganado (Ashmore et al, 1974, Growth, 38: 501-507; Swatland y Kieffer, J. Anim Sci, 1994, 38: 752-757; McPherron y Lee, Proc Natl Acad Sci USA., 1997, 94: 12.457-12.461; y Kambadur et al, Genome Res, 1997, 7: 910 a 915) y, sorprendentemente, en los seres humanos (Schuelke et al., N Engl J Med 2004; 350: 2682-8). Los estudios también han demostrado que el desgaste muscular asociado con la infección por VIH en seres humanos está acompañado de aumentos en la expresión de proteínas GDF8 (González-Cadavid et al, PNAS, 1998, 95: 14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, la creatina quinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos (WO 00/43781). El péptido de GDF8 puede unirse de forma no covalente al dímero del dominio de GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono et al (1988) J. Biol Chem., 263: 6.407-6.415; Wakefield et al (1988) J. Biol Chem., 263; y Brown et al (1990) Growth factors, 3; 7.646-7.654: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o proteínas estructuralmente relacionadas e inhiben su actividad biológica incluyen folistatina, y potencialmente, proteínas relacionadas con la folistatina (Gamer et al (1999) Dev Biol, 208: 222-232).

**[0027]** El factor-11 de crecimiento y diferenciación (GDF-11), también conocido como BMP-11, es una proteína secretada (McPherron et al, 1999, Nat Genet 22: 260-264). GDF-11 se expresa en el brote de la cola, yema de la extremidad, arcos de mandíbula superior e inferior, y ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima et al, 1999, Mech Dev 80: 185-189). GDF-11 desempeña un papel único en el patrón de tejidos mesodérmicos y neurales (Gamer et al, 1999, Dev Biol, 208: 222-32). GDF-11 mostró ser un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de la extremidad de pollo (Gamer et al, 2001, Dev Biol 229: 407-20). La expresión de GDF-11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de una manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF-11 en el cerebro sugiere que GDF-11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Curiosamente, GDF-11 se encontró que inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu et al, 2003, Neuron 37: 197-207). Por lo tanto, GDF-11 puede tener aplicaciones in vivo e in vitro en el tratamiento de enfermedades, tales como las enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

**[0028]** La proteína morfogenética ósea (BMP-7), también llamada proteína-1 osteogénica (OP-1), es bien conocida por inducir la formación de cartílago y hueso. Además, BMP7 regula una gran variedad de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP-7 puede ser el factor osteoinductivo responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se encontró que la BMP-7 juega un papel en la regulación de la homeostasis del calcio y del hueso. Al igual que la activina, BMP-7 se une a receptores de tipo II, ActRIIA y IIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan receptores de tipo I distintos en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor de tipo I BMP7 observado fue ALK2, mientras que la activina se unía exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina provocaron respuestas biológicas distintas y activan diferentes vías de Smad (Macias-Silva et al, 1998, J Biol Chem. 273: 25628-36).

**[0029]** En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere al uso de ciertos polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) para antagonizar la señalización de ligandos de ActRIIB en general, en cualquier proceso asociado con la actividad de ActRIIB. Opcionalmente, los polipéptidos ActRIIB de la descripción pueden antagonizar uno o más ligandos de receptores de ActRIIB, tales como activina, Nodal, GDF8, GDF-11, y BMP-7, y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales.

**[0030]** Por lo tanto, la presente descripción contempla el uso de polipéptidos ActRIIB en el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones que están asociadas con la actividad anormal de ActRIIB o un ligando de ActRIIB. ActRIIB o ligandos de ActRIIB están implicados en la regulación de muchos procesos biológicos críticos. Debido a sus funciones clave en estos procesos, pueden ser dianas deseables para la intervención terapéutica. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB, (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) se pueden usar para tratar trastornos o afecciones humanas o

animales. En particular, la presente descripción proporciona una evidencia sorprendente de que los antagonistas de la señalización de ActRIIB, tales como proteínas de fusión ActRIIB-Fc, pueden abordar directamente el defecto subyacente en pacientes con deficiencia de distrofina aumentando el nivel de utrofina presente en el sarcolema. Mientras que las publicaciones anteriores han indicado que tales agentes pueden ser útiles para aumentar la masa muscular y la fuerza en pacientes con distrofia muscular, estos datos indican que dichos agentes pueden tener un efecto directo sobre la fragilidad de la fibra muscular en los pacientes con DMD y BMD. Estos trastornos y afecciones se discuten más adelante en "Usos terapéuticos de ejemplo".

**[0031]** Los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se utiliza cada término. Ciertos términos se discuten a continuación o en otra parte en la memoria para proporcionar orientación adicional para el practicante en la descripción de las composiciones y procedimientos de la descripción y de cómo fabricar y usarlas. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se utiliza el término.

**[0032]** "Aproximadamente" significa en general un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de ejemplo de error están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5% de un valor determinado o intervalo de valores.

**[0033]** Alternativamente, y particularmente en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor determinado. Las cantidades numéricas indicadas aquí son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "aproximadamente" se puede deducir cuando no se indique expresamente.

**[0034]** Los procedimientos de la descripción pueden incluir etapas de comparar las secuencias entre sí, incluyendo la secuencia de tipo natural a una o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímero, por ejemplo, usando programas y/o algoritmos de alineación de secuencias que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, para nombrar algunos). El experto en la materia puede entender fácilmente que, en tales alineaciones, cuando una mutación contiene una inserción o delección de residuos, la alineación de secuencias introducirá un "hueco" (normalmente representado por un guión, o "A") en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

**[0035]** "Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos que las codifican) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

**[0036]** El término "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

**[0037]** Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente," puede referirse a similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen evolutivo común.

## 2. Polipéptidos ActRIIB

**[0038]** La invención se refiere a polipéptidos variantes de ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles). Opcionalmente, los fragmentos, variantes funcionales, y formas modificadas tienen actividades biológicas similares o iguales de sus polipéptidos ActRIIB de tipo natural correspondientes. Por ejemplo, una variante de ActRIIB se puede unir a e inhibir la función de un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF-11 o BMP-7). Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB modula el crecimiento de los músculos. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2), y los polipéptidos ActRIIB humano solubles (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1, 5, y 12).

**[0039]** La descripción identifica porciones funcionalmente activas y variantes de ActRIIB. Los solicitantes han comprobado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia descrita por Hilden et al. (Blood 15 abril 1994; 83 (8): 2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la SEQ ID NO: 2 (A64), tiene una afinidad relativamente baja para la activina y GDF-11. Por el contrario, la misma proteína Fc de fusión con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y GDF-11 en el intervalo de bajo nanomolar a alto picomolar. Por lo tanto, una secuencia con R64 se utiliza como la secuencia de referencia de tipo natural para ActRIIB humano en esta descripción.

[0040] Attisano et al. (Cell 10 enero 1992; 68 (1): 97-108) mostraron que una delección del nudo de prolina en el C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor para la activina. Los datos presentados en este documento muestran que una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 2, "ActRIIB (20-119)-Fc" ha reducido la unión a GDF-11 y activina con relación a un ActRIIB (20-134)-Fc que incluye la región nudo de prolina y el dominio yuxtamembrana completo. Sin embargo, un ActRIIB (20-129)-Fc retiene una actividad similar pero algo reducida con relación a la de tipo natural, aunque la región de nudo de prolina se interrumpe. Por lo tanto, los dominios extracelulares de ActRIIB que paran en los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 se espera que todos estén activos, pero las construcciones de parada en 134 o 133 pueden ser más activas. Del mismo modo, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión a ligando en grandes márgenes. En apoyo a 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 temprano como en el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, formas que terminan en o entre 109 y 119 se espera que tengan una unión a ligando reducida. El aminoácido 119 está poco conservado y también se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o más tarde conservan la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Cualquiera de estas formas puede ser deseable de utilizar, dependiendo de las condiciones clínicas o experimentales.

[0041] En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes retendrá la actividad de unión a ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación ligada a N sin afectar sustancialmente a la unión del ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión de la señal y la región reticulada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29 son bien toleradas. En particular, las construcciones que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 conservarán su actividad, y también se espera que las construcciones que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 retengan la actividad. Una construcción que empieza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

[0042] En conjunto, una parte activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, y las construcciones pueden, por ejemplo, empezar en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición de 20 a 29 o 21 a 29 y terminan en una posición de 119 a 134, 119 a 133 o 129 a 134, 129 a 133. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición de 20 a 24 (o 21 a 24, o 22 a 25) y terminan en una posición de 109 a 134 (o 109 a 133), de 119 a 134 (o de 119 a 133) o de 129 a 134 (o de 129 a 133). También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, en particular los que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la parte correspondiente de SEQ ID NO: 2.

[0043] La descripción incluye los resultados de un análisis de estructuras compuestas de ActRIIB, mostradas en la figura 5, que demuestra que el bolsillo de unión al ligando está definido por 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. En estas posiciones, se espera que las mutaciones conservativas sean toleradas, aunque una mutación K74A es bien tolerada, como lo son R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en Xenopus, lo que indica que se tolerarán aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es R en ActRIIB bovino 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. Por lo tanto, una fórmula general para una proteína variante de ActRIIB activa es una que comprende los aminoácidos 29-109, pero opcionalmente empezando en una posición que oscila de 20 a 24 o de 22 a 25 y termina en una posición que varía de 129 a 134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservativos de aminoácidos en el bolsillo de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión a ligando. Dicha proteína puede retener más del 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2. Los sitios fuera de la bolsa de unión, en la que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxilo del dominio extracelular (como se señaló anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) realmente mejora la unión a ligando en la base de A64, y por lo tanto se espera que no tenga ningún efecto perjudicial sobre la unión a ligando en la base de R64. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 en la base A64, demostrando así que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A está mal tolerado, R64K está bien tolerado, y por lo tanto otro residuo básico, tal como H, puede ser tolerado en la posición 64.

[0044] ActRIIB está bien conservada a través de casi todos los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular conservado completamente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están altamente conservados. En consecuencia, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan una visión de los residuos que pueden ser alterados (Figura 6). Por lo tanto, una variante de ActRIIB activa, humana puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIB vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de la secuencia humana u otra secuencia de vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran este

enfoque para definir una variante de ActRIIB activo. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus*, y por tanto esta posición puede ser alterada, y, opcionalmente, se puede alterar a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo no polar tal como A. E52 es una K en *Xenopus*, lo que indica que este sitio puede ser tolerante de una amplia variedad de cambios, incluyendo residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, lo que indica que una amplia variación estructural se tolera en esta posición, con residuos polares favorecidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G y Y. F108 es Y en *Xenopus*, y por lo tanto Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L, debe ser tolerado. E111 es K en *Xenopus*, lo que indica que residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos básicos son tolerados en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 está relativamente mal conservada, y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, así esencialmente cualquier aminoácido debe ser tolerado en esta posición.

**[0045]** La descripción demuestra que la adición de un sitio de glicosilación ligado a N adicional (N-X-S/T) aumenta la vida media en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, con respecto a la forma ActRIIB (R64)-Fc. Mediante la introducción de una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia de NXT que confiere una vida media más larga. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque ésta última no pueden estar glicosilada de manera eficiente con la R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T pueden ser generalmente introducidas en las posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definido en la figura 5. 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. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el enlazador entre la secuencia de ActRIIB y la Fc u otro componente de fusión. Dicho sitio puede ser introducido con el mínimo esfuerzo mediante la introducción de N en la posición correcta con respecto a S o T preexistentes, o mediante la introducción de S o T en una posición correspondiente a N preexistente. Por lo tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación ligado a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se predice que sea glicosilada puede alterarse a T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección conferida por la glicosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que sea glicosilada puede alterarse a S. Por lo tanto se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Asimismo, en una variante de A24N, puede utilizarse una alteración S26T. Por consiguiente, una variante de ActRIIB puede incluir una o más secuencias de consenso de glicosilación ligada a N no endógenas adicionales.

**[0046]** La posición L79 puede alterarse para conferir propiedades de unión alterada de activina - miostatina (GDF-11). L79A o L79P reduce la unión de GDF-11 a un mayor grado que la unión a activina. L79E o L79D conserva la unión a GDF-11. Sorprendentemente, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión a activina. Los experimentos in vivo indican que estos receptores no activina retienen la capacidad significativa para aumentar la masa muscular, pero muestran una disminución en los efectos sobre otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y la factibilidad para la obtención de polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina.

**[0047]** Las variaciones descritas pueden combinarse de diversas maneras. Además, los resultados del programa de mutagénesis descritos en el presente documento indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que son a menudo beneficiosos para conservar. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófoba y, particularmente, triptófano), la posición 37 (ácido, y en particular ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, en particular fenilalanina o tirosina). De este modo, en cada una de las variantes descritas en este documento, la descripción proporciona un armazón de aminoácidos que puede conservarse. Otras posiciones que pueden ser deseables de conservar son los siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido), 98 (polar o cargada, en particular E, D, R o K).

**[0048]** En ciertos casos, los fragmentos aislados de los polipéptidos de ActRIIB se puede obtener mediante el cribado de polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NOs: 3 y 4). Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como química en fase sólida Merrifield convencional f-Moc o t-Boc. Los fragmentos pueden ser producidos (de forma recombinante o por síntesis química) y examinados para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando de ActRIIB.

**[0049]** En ciertos casos, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIB tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 12, y 23. En algunos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 12, y 23.

**[0050]** En ciertos casos, la presente descripción contempla producir variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido ActRIIB para fines, tales como mejorar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ejemplo,

vida media ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vino). Los polipéptidos ActRIIB modificados también pueden ser producidos, por ejemplo, por sustitución, delección, o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservativas) no tendrán un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB da lugar a un homólogo funcional se puede determinar fácilmente mediante la evaluación de la capacidad de la variante del polipéptido ActRIIB para producir una respuesta en células de una manera similar a la del polipéptido ActRIIB de tipo natural, o para unirse a uno o más ligandos, tales como activina, GDF-11 o miostatina en una manera similar a su forma natural.

**[0051]** En ciertos casos específicos, la presente descripción contempla realizar mutaciones en el dominio extracelular (también referido como dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB de manera que la variante (o mutante) de polipéptido ActRIIB ha alterado las actividades de unión al ligando (por ejemplo, la afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, tales polipéptidos ActRIIB variantes han alterado la afinidad de unión (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos ActRIIB variantes han alterado la especificidad de unión de sus ligandos.

**[0052]** Por ejemplo, la descripción proporciona polipéptidos ActRIIB variantes que se unen preferiblemente a GDF8/GDF-11 en relación con activinas. La descripción establece, además, la conveniencia de tales polipéptidos para reducir los efectos fuera del objetivo, a pesar de que dichas variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves, donde pueden ser necesarias grandes ganancias en la masa muscular para el efecto terapéutico y donde un cierto nivel de efecto fuera del objetivo es aceptable. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80, y F101, están en el bolsillo de unión a ligando y median en la unión a sus ligandos, tales como activina y GDF8. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, dominio de unión a GDF8) de un receptor de ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando, tal como GDF8, con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor de ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF8 sobre la activina. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de  $K_d$  para unión a activina con respecto a  $K_d$  para unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor con respecto a la relación del dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de  $IC_{50}$  para la inhibición de activina con respecto a  $IC_{50}$  para inhibir GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8 con una  $IC_{50}$  de al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la  $IC_{50}$  para la inhibición de la activina.

**[0053]** Como ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB se puede mutar a un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el polipéptido ActRIIB variante se une preferiblemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo, y un residuo de aminoácido hidrofóbico. Como ejemplo más específico, el residuo hidrofóbico L79 puede ser alterado a los aminoácidos ácidos aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión a activina a la vez que se conserva la unión a GDF11. Como se reconocerá por un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas, se pueden hacer a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccional o síntesis química. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica.

**[0054]** En ciertos casos, la presente descripción contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIB para alterar la glicosilación del polipéptido. Los sitios de glicosilación de ejemplo en polipéptidos ActRIIB se ilustran en la Figura 2. Tales mutaciones pueden seleccionarse a fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tal como sitios de glicosilación ligados a N u O. Los sitios de reconocimiento de glicosilación ligados a asparagina comprenden generalmente una secuencia de triptido, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido), que es reconocida específicamente por enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo natural (para sitios de glicosilación ligados a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas posiciones primera o tercera de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro modo de aumentar el número de grupos carbohidrato en un polipéptido ActRIIB es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares puede estar unido a (a) arginina e histidina; (B) grupos carboxilo libres; (C) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína; (D) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina; (E) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en el

documento WO 87/05330, publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., Pág.. 259-306. La eliminación de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIB se puede realizar química y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La desglicosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos ActRIIB se puede lograr mediante el uso de una variedad de endoglicosidasas y exoglicosidasas, tal como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138: 350. La secuencia de un polipéptido ActRIIB se puede ajustar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamífero, de levadura, de insectos y de plantas pueden todas introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden ser afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para el uso en seres humanos serán expresadas en una línea celular de mamífero que proporciona una glicosilación adecuada, tal como líneas de células HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas de células de expresión de mamífero también sean útiles.

**[0055]** Esta descripción contempla además un procedimiento de generación de variantes, en particular conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido de ActRIIB, incluyendo, opcionalmente, variantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El propósito de cribar dichas bibliotecas combinatorias puede ser la de generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIB que han alterado las propiedades, tales como farmacocinética alterada, o unión a ligando alterada. A continuación se proporcionan una variedad de ensayos de cribado y tales ensayos se puede usar para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRIIB se puede cribar por la capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIB para evitar la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB.

**[0056]** La actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes también se pueden ensayar en un ensayo in vivo o basado en células. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRIIB en la expresión de genes implicados en la producción de hueso en un osteoblasto o precursor. Esto se puede llevar a cabo, según sea necesario, en presencia de una o más proteína ligando de ActRIIB recombinante (por ejemplo, BMP7), y las células se pueden transfectar con el fin de producir un polipéptido ActRIIB y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActRIIB. Del mismo modo, un polipéptido ActRIIB se puede administrar a un ratón u otro animal, y pueden evaluarse una o más propiedades del hueso, tales como la densidad o volumen. La tasa de curación de fracturas óseas también puede ser evaluada. Del mismo modo, la actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes se puede ensayar en células musculares, adipocitos y células neuronales por cualquier efecto sobre el crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los ensayos, tal como se describen a continuación. Tales ensayos son bien conocidos y rutinarios en la técnica. Puede usarse un gen reportero sensible a SMAD en dichas líneas celulares para controlar los efectos sobre la señalización aguas abajo.

**[0057]** Pueden generarse variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva con relación a un polipéptido ActRIIB de origen natural. Tales proteínas variantes, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes al polipéptido ActRIIB de tipo natural correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que dan lugar a la destrucción de, o de otro modo, la inactivación de un polipéptido ActRIIB nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido ActRIIB mediante la modulación de la vida media de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a más efectos biológicos transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRIIB recombinante dentro de la célula.

**[0058]** En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB de la descripción pueden comprender, además, modificaciones post-traduccionales en adición a cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, polisacáridos o monosacáridos, y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB se pueden ensayar, tal como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptidos ActRIIB. Cuando un polipéptido ActRIIB se produce en células por escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento post-traducciona también puede ser importante para el plegamiento y/o función correctos de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden ser elegidas para asegurar la modificación y procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIB.

**[0059]** En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas

de fusión que tienen al menos una parte de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina de suero humano. Un dominio de fusión puede seleccionarse de modo que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el propósito de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpress® (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, un dominio de fusión se pueden seleccionar de manera que facilite la detección de los polipéptidos ActRIIB. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como "etiquetas epitópicas", que son generalmente secuencias cortas de péptidos para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas epitópicas bien conocidas para las que anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA), y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo liberen las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión mediante la posterior separación cromatográfica. En ciertos casos preferidos, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizador" se entiende algo que aumente la vida media en suero, independientemente de si esto es debido a una menor destrucción, menor depuración por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Las fusiones con la parte Fc de una inmunoglobulina son conocidas por conferir propiedades farmacocinéticas deseables en una amplia gama de proteínas. Del mismo modo, las fusiones con albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden ser seleccionados incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como una mayor estimulación del crecimiento del músculo).

**[0060]** Como ejemplo específico, la presente descripción proporciona una proteína de fusión como antagonista de GDF8 que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, unión a GDF8) fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 13).

```

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

```

**[0061]** Preferiblemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en los 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 (por ejemplo, la mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida de unirse al receptor Fcγ en relación a un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene capacidad aumentada de unirse al receptor Fc relacionado con MHC de clase I (FcRn) con respecto a un dominio Fc de tipo natural.

**[0062]** Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden estar dispuestos de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede estar situado C-terminal a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede estar situado C-terminal a un polipéptido ActRIIB. El dominio de polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no tienen que estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales C- o N-terminal al dominio o entre los dominios.

**[0063]** En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB de la presente descripción contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la vida media in vitro de los polipéptidos ActRIIB, aumentan la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIB), y modificaciones de resto de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidratos de

un polipéptido ActRIIB). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas, tales como un resto de carbohidrato, o polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

**[0064]** En ciertos casos, la presente descripción proporciona formas aisladas y/o purificadas disponibles de polipéptidos ActRIIB, que se aíslan de, o de otro modo están sustancialmente libres de, otras proteínas.

**[0065]** En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB (modificados o no modificados) de la descripción pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos ActRIIB se pueden sintetizar utilizando técnicas de química de proteínas convencionales, tales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant GA (ed.), Synthetic Peptides: a User's Guide WH Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, se encuentran disponibles comercialmente sintetizadores de péptidos automatizados (por ejemplo, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, los polipéptidos ActRIIB, fragmentos o variantes de los mismos, pueden ser producidos de manera recombinante usando diversos sistemas de expresión (por ejemplo, E. coli, células de ovario de hámster chino, células COS, baculovirus), tal como es bien conocido en la técnica (véase también a continuación). En un ejemplo adicional, los polipéptidos ActRIIB modificados o no modificados se pueden producir mediante digestión de polipéptidos ActRIIB de longitud completa de origen natural o producidos de manera recombinante usando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina, o enzima conversora de aminoácido básico emparejado (PACE). El análisis por ordenador (usando un software comercialmente disponible, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) se puede utilizar para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, dichos polipéptidos ActRIIB pueden producirse a partir de polipéptido ActRIIB de longitud completa de origen natural o producido de manera recombinante, tal como técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mediante escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

### 3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB

**[0066]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles), incluyendo cualquiera de las variantes descritas en este documento. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB de origen natural (figura 4), mientras que la SEQ ID NO: 3 codifica un polipéptido ActRIIB soluble (Figura 3). Los ácidos nucleicos objeto pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en procedimientos para la fabricación de polipéptidos ActRIIB o como agentes directos terapéuticos (por ejemplo, en una estrategia de terapia génica).

**[0067]** En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos objeto que codifican polipéptidos ActRIIB se entienden que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas; e incluirán, por lo tanto, secuencias de codificación que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación designada en la SEQ ID NO: 4.

**[0068]** En ciertos casos, la descripción proporciona secuencias de ácidos nucleicos aislados o recombinantes que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID NO: 3. Un experto en la materia entenderá que secuencias de ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO: 3, y variantes de la SEQ ID NO: 3 también están dentro del alcance de esta descripción. En otros casos, las secuencias de ácidos nucleicos de la descripción pueden estar aisladas, recombinantes, y/o se fusionan con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

**[0069]** En otros casos, los ácidos nucleicos de la descripción también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 3, secuencia complementaria de SEQ ID NO: 3, o fragmentos de las mismas. Como se discutió anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN. Un experto en la materia entenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constante mientras se cambia la otra variable. En un caso, la descripción proporciona ácidos nucleicos que se hibridan

bajo condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido por un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

**[0070]** Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos expuestos en SEQ ID NO: 3 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, un número 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 lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que conduzcan a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto entre las células de mamíferos. Un experto en la materia entenderá que pueden existir estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular entre los individuos de una especie determinada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas de dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta descripción.

**[0071]** En ciertos casos, los ácidos nucleicos recombinantes de la descripción pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas son conocidos en la técnica para una variedad de células huésped. Típicamente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica también se contemplan en la descripción. Los promotores pueden ser promotores de origen natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En un ejemplo preferido, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

**[0072]** En ciertos aspectos de la descripción, el ácido nucleico objeto se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y está unida operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIB. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Las secuencias reguladoras de ejemplo se describen en Goeddel; Gen Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se unen operativamente a ella pueden usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Dichas secuencias de control de la expresión útiles, incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor tet, promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por T7 RNA polimerasa, las principales regiones operadora y promotora del fago lambda, las regiones de control para proteína de la cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores los factores de  $\alpha$ -apareamiento, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores, tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína deseada a expresar. Por otra parte, también debe considerarse 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 de antibióticos,.

**[0073]** Un ácido nucleico recombinante de la descripción pueden producirse mediante la ligación del gen clonado, o una parte del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levaduras, aviar, de insecto o de mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como E. coli.

**[0074]** Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, y una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos en células tanto procariotas como

eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus, tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden ser utilizados para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retroviral) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de liberación de terapia génica. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus 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  $\beta$ -gal beta que contiene pBlueBac III).

**[0075]** En un ejemplo preferido, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIB objeto en células CHO, tal como un vector pCMV-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, las construcciones de genes objeto pueden usarse para causar la expresión de los polipéptidos ActRIIB objeto en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

**[0076]** Esta descripción se refiere también a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) para uno o más del polipéptido ActRIIB objeto. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB de la descripción se puede expresar en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, utilizando un sistema de expresión de baculovirus), levaduras o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

**[0077]** Por consiguiente, la presente descripción se refiere además a procedimientos para producir polipéptidos ActRIIB objeto. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y un medio que contiene los polipéptidos ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB puede ser retenido citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células se recogen, se lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActRIIB objeto se pueden aislar del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIB. En un caso preferido, el polipéptido ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

**[0078]** En otro ejemplo, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de poli-(His)/sitio de escisión por enteroquinasa en el N-terminal de la parte deseada del polipéptido ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina de metal  $Ni^{2+}$ . La secuencia líder de purificación puede extraerse posteriormente por tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIB purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al, (1987) *J. Chromatography* 411: 177; y Janknecht et al, *PNAS USA*. 88: 8.972) .

**[0079]** Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para la ligación, la digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, el relleno con extremos cohesivos según sea apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable, y ligación enzimática. En otro ejemplo, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica quimérica (ver, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons: 1992).

#### 4. Anticuerpos

**[0080]** Otro aspecto de la descripción se refiere a los anticuerpos. Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB soluble) y que se une competitivamente con el polipéptido ActRIIB se puede utilizar como un antagonista de las actividades de polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, mediante el uso de inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIB, se pueden fabricar anticuerpos monoclonales o antisuero anti-

proteína/anti-péptido mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed por Harlow y 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 ActRIIB, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta del anticuerpo, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación con vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Una parte inmunogénica de un polipéptido ActRIIB se puede administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede monitorizarse mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Se pueden usar un ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

**[0081]** Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIB, los antisueros se pueden obtener y, si se desea, los anticuerpos policlonales pueden ser aislados del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos de fusión de células somáticas estándar con células inmortalizantes, tales como células de mieloma, para producir células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en el sector, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar et al, (1983) Immunology Today, 4: 72), y la técnica de hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al, (1985.) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pág. 77-96). Las células de hibridoma se pueden cribar inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIB y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

**[0082]** El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido de ActRIIB objeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos pueden cribarse para la utilidad de la misma manera que se describió anteriormente para los anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab)<sub>2</sub> tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo de la presente descripción pretende incluir además moléculas biespecíficas, de cadena única y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido ActRIIB conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. En casos preferidos, el anticuerpo comprende además un marcador unido al mismo y capaz de detectarse (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor de enzima).

**[0083]** En ciertos casos preferidos, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo monoclonal, y en ciertos casos, la descripción proporciona procedimientos disponibles para la generación de nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un procedimiento para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActRIIB puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido ActRIIB eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y probar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRIIB. Una vez obtenido, un hibridoma puede ser propagado en un cultivo de células, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRIIB. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo celular.

**[0084]** El adjetivo "específicamente reactivo con" tal como se utiliza en referencia a un anticuerpo pretende significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB) y otros antígenos que no son de interés, que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos procedimientos que emplean el anticuerpo, como las aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) para discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de la interacción anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada puede alcanzarse con un intervalo de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  o menos.

**[0085]** Además, las técnicas utilizadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable puede influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se utiliza para unirse a un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión en solución. Están disponibles una variedad de técnicas diferentes para ensayar la interacción entre los anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, el ensayo de unión de Biacore, Biacore AB, Upåg.sala, Suecia), ensayos de sándwich (por ejemplo, el sistema de micropartículas paramagnéticas de

IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación, e inmunohistoquímica.

**[0086]** En ciertos aspectos, la descripción proporciona anticuerpos que se unen a un polipéptido ActRIIB soluble. Tales anticuerpos pueden ser generados tanto como se describió anteriormente, usando un polipéptido ActRIIB soluble o fragmento del mismo como antígeno. Los anticuerpos de este tipo se pueden utilizar, por ejemplo, para detectar polipéptidos ActRIIB en muestras biológicas y/o para controlar los niveles de polipéptidos ActRIIB solubles en un individuo. En ciertos casos, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido ActRIIB soluble se puede utilizar para modular la actividad de un polipéptido de ActRIIB y/o un ligando de ActRIIB, regulando de este modo (promoviendo o inhibiendo) el crecimiento de tejidos, tales como hueso, cartílago, músculo, grasa, y neuronas, o aumentando la utrofina en el sarcolema.

#### 5. Ensayos de cribado

**[0087]** En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere al uso de los polipéptidos ActRIIB objeto (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados a través de este cribado pueden probarse en tejidos, tales como hueso, cartílago, músculo, grasa, y/o neuronas, para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido in vitro. Opcionalmente, estos compuestos pueden examinarse adicionalmente en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido in vivo.

**[0088]** Hay numerosos enfoques para cribar agentes terapéuticos para modular el crecimiento del tejido mediante el direccionamiento de los polipéptidos ActRIIB. En ciertos casos, el cribado de alto rendimiento de compuestos puede llevarse a cabo para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB sobre el crecimiento de hueso, cartílago, músculo, grasa, y/o neuronas. En ciertos casos, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben específicamente o reducen la unión de un polipéptido ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF-11 o BMP-7). Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIB a su proteína de unión, tal como un ligando de ActRIIB. En un caso adicional, los compuestos pueden ser identificados por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

**[0089]** Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente descripción, aquellos que no se describen expresamente en este documento serán sin embargo comprendidos por una persona experta en la materia. Tal como se describe en el presente documento, los compuestos de ensayo (agentes) de la descripción pueden crearse mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) para ser probados por su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento de tejido pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producidos de forma recombinante. Los compuestos de ensayo contemplados por la presente descripción incluyen moléculas no peptídicas orgánicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas, y moléculas de ácido nucleico. En un ejemplo específico, el agente de ensayo es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 daltons.

**[0090]** Los compuestos de ensayo de la descripción se pueden proporcionar como entidades individuales, discretas, o se proporcionan en bibliotecas de mayor complejidad, tales como fabricadas mediante química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser en una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden ser derivatizados opcionalmente con otros compuestos y tienen grupos derivatizantes que facilitan el aislamiento de los compuestos de derivación. Ejemplos no limitativos de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, micropartículas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes de reticulación fotoactivables o cualquiera de sus combinaciones.

**[0091]** En muchos programas de cribado de fármacos que ensayan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento a fin de maximizar el número de compuestos estudiados en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como pueden ser derivados con proteínas purificadas o semipurificadas, son a menudo preferidos como cribados "primarios" en que pueden generarse para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de ensayo pueden ignorarse generalmente en el sistema in vitro, centrándose en cambio el ensayo en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión (por ejemplo, un ligando de ActRIIB).

[0092] Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado de ejemplo de la presente descripción, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que ordinariamente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB, se añade a continuación una composición que contiene un ligando de ActRIIB. La detección y cuantificación de complejos de ligandos ActRIIB/ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade el ligando ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y se cuantifica la formación de complejo de ligando ActRIIB/ActRIIB en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en que se pueden mezclar los reactivos puede variar, y se pueden mezclar de forma simultánea. Por otra parte, en lugar de proteínas purificadas, se pueden utilizar extractos celulares y lisados para hacer un sistema de ensayo libre de células adecuado.

[0093] La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como polipéptido ActRIIB radiomarcado (por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ ), marcado fluorescentemente (por ejemplo, FITC) o marcado enzimáticamente o su proteína de unión, mediante inmunoensayo o por detección cromatográfica.

[0094] En ciertos casos, la presente descripción contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, ya sea directa o indirectamente, del grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y la Patente de Estados Unidos No. 5.677.196), resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza de superficie, son compatibles con muchos casos de la descripción.

[0095] Además, la presente descripción contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos. No. 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72: 223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; y Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696). En un ejemplo específico, la presente descripción contempla el uso de dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, pequeñas moléculas o péptidos) que disocian interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27: 919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17: 374-81; y las patentes de los Estados Unidos. Nos. 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

[0096] En ciertos casos, los compuestos objeto se identifican por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB de la descripción. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse a nivel de proteínas utilizando procedimientos bioquímicos in vitro, incluyendo fotoreticulación, unión a ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al, 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden cribarse en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir una unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB se puede transfectar con un sistema reportero (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y cribar frente a la biblioteca preferiblemente mediante un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden utilizar ensayos de unión basados en otro mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, micropartícula o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o separada por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse generalmente mediante colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmón de superficie.

[0097] En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos y agentes para estimular el crecimiento muscular y aumentar la masa muscular, por ejemplo, mediante la antagonización de funciones de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando de ActRIIB. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede ensayarse en células enteras o tejidos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento muscular o alterar los niveles de utrofina en el sarcolema. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para este propósito. Por ejemplo, los procedimientos de la descripción se realizan de tal manera que se ha reducido o inhibido la transducción de señales a través de una proteína ActRIIB activada mediante la unión a un ligando de ActRIIB (por ejemplo, GDF8). Se entenderá que el crecimiento de tejido muscular en el organismo daría lugar a un aumento de masa muscular en el organismo en comparación con la masa muscular de un organismo correspondiente (o población de organismos) en el que la

transducción de señales a través de una proteína ActRIIB no se había realizado.

[0098] Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIB o compuestos de ensayo sobre el crecimiento/proliferación de células musculares puede determinarse mediante la medición de la expresión génica de Pax-3 y Myf-5 que están asociados con la proliferación de células miogénicas, y la expresión génica de MyoD que está asociada con la diferenciación del músculo (por ejemplo, Amthor et al, Dev Biol 2002.251: 241-57). Se sabe que GDF8 regula por disminución la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, e impide la expresión del gen de MyoD. Se espera que los polipéptidos ActRIIB o compuestos de ensayo antagonicen la actividad de GDF8. Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye la medición de la proliferación de mioblastos, tales como mioblastos C(2)C(12) en presencia de los polipéptidos ActRIIB o compuestos de ensayo (por ejemplo, Thomas et al, J Biol Chem 2000.275: 40235-43).

[0099] La presente descripción también contempla ensayos in vivo o ex vivo para medir la masa y fuerza muscular. Por ejemplo, Whittemore et al. (Biochem Biophys Res Commun 2003, 300: 965-71) describen un procedimiento para medir la masa aumentada de músculo esquelético y la fuerza de agarre aumentada en ratones. Opcionalmente, este procedimiento se puede utilizar para determinar los efectos terapéuticos de los compuestos de ensayo (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) en enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo enfermedades para las que la masa muscular es limitante. Además, la respuesta mecánica de un músculo a la contracción repetida se puede utilizar para evaluar la integridad fisiológica del músculo después de la intervención terapéutica. Por ejemplo, modelos de ratón de la distrofia muscular suelen mostrar una disminución excesiva de la fuerza tetánica máxima después de una serie de contracciones excéntricas, durante las que las fibras musculares se alargan a medida que ejercen fuerza (contracción). Una disminución más pequeña en la fuerza después de la administración de un agente terapéutico (por ejemplo, polipéptido ActRIIB) puede indicar efectos beneficiosos sobre la integridad del sarcolema. Por lo tanto, Krag et al. (2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 13.856-13.860) describen un procedimiento para la realización de dichos ensayos con músculos aislados ex vivo. Alternativamente, Blaauw et al. (2008, Hum Mol Genet 17: 3.686-3.696) describen un procedimiento para dichos ensayos in vivo.

[0100] Se entiende que los ensayos de cribado de la presente descripción se aplican no sólo a los polipéptidos ActRIIB objeto y variantes de los polipéptidos ActRIIB, sino también a cualquiera de los compuestos de ensayo, incluyendo agonistas y antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Además, estos ensayos de cribado son útiles para la verificación de la diana del fármaco y con fines de control de calidad.

## 6. Usos terapéuticos de ejemplo

[0101] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección que está asociada con la actividad anormal de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando de ActRIIB (por ejemplo, GDF8). Estas enfermedades, trastornos o afecciones se denominan generalmente en este documento como "afecciones asociadas a ActRIIB." En ciertos casos, la presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno, o afección en un individuo en necesidad del mismo a través de la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ActRIIB, tal como se describe anteriormente. Estos procedimientos están particularmente dirigidos a tratamientos terapéuticos y profilácticos de los animales, y más particularmente, seres humanos.

[0102] Tal como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición de la enfermedad o afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control sin tratar. El término "tratar", tal como se usa en este documento, incluye la profilaxis de la afección nombrada o la mejora o eliminación de la afección una vez se ha establecido.

[0103] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB solubles de la invención se utilizan como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. El término "distrofia muscular" se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por un debilitamiento gradual y el deterioro de los músculos esqueléticos y algunas veces el corazón y los músculos respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por la pérdida de masa muscular progresiva y debilidad que comienzan con cambios microscópicos en el músculo. A medida que los músculos se degeneran con el tiempo, disminuye la fuerza muscular de la persona. En particular, las distrofias musculares causadas por pérdida de la función de la distrofina que se pueden tratar con un régimen que incluye polipéptidos ActRIIB objeto incluyen la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de Becker.

[0104] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en la década de 1860 y es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en los hombres, que afecta a uno de cada 3.500 niños. La DMD está causada por mutaciones o delecciones en el gen de la distrofina que impiden la formación de la proteína distrofina de longitud completa. Los hombres están particularmente en riesgo de

defectos en la distrofina debido a que poseen una sola copia del gen de la distrofina, que está situado en el cromosoma X. La distrofina funciona normalmente como un componente crítico de un complejo multiproteico que conecta la membrana plasmática (sarcolema) de la célula muscular (fibra) con el citoesqueleto y la matriz extracelular de actina, estabilizando de este modo el sarcolema durante las contracciones de las fibras. En ausencia de distrofina funcional, el sarcolema y finalmente toda la fibra muscular son fácilmente dañados durante los ciclos de contracción y relajación. En el inicio del desarrollo de la DMD, el músculo se compensa por regeneración, pero las células progenitoras musculares finalmente no pueden mantener en daño continuo, y el músculo sano es reemplazado por tejido fibro-graso no funcional.

**[0105]** La distrofia muscular de Becker (BMD) es el nombre del médico alemán Emil Peter Becker, quien describió por primera vez esta variante de la DMD en la década de 1950. La BMD resulta de diferentes mutaciones en el gen de la distrofina. Los pacientes con BMD tienen algo de distrofina, pero es insuficiente, ya sea en cantidad o en poca calidad. Tener alguna funcionalidad de la distrofina protege los músculos de los que tienen BMD de la degeneración negativa o rápida de las personas con DMD.

**[0106]** La utrofina, una proteína autosómica estructuralmente similar a la distrofina, se expresa en términos generales con la distrofina en el sarcolema durante el desarrollo embrionario. La expresión de la utrofina en el músculo disminuye normalmente en el momento del nacimiento y se restringe en las fibras maduras a las uniones neuromusculares y las uniones músculo-tendón. Las evidencias convincentes sugieren que la utrofina podría sustituir a la distrofina y proporcionar beneficios terapéuticos en pacientes con distrofia muscular si se puede diseñar un procedimiento para aumentar los niveles de utrofina a lo largo del sarcolema, como en el desarrollo temprano (Miura et al, 2006, Trends Mol Med 12: 122- 129). En una prueba de principio experimental, la expresión transgénica de la utrofina en el músculo dio lugar a una recuperación completa de la función mecánica normal y la prevención de la distrofia muscular en un modelo de ratón *mdx* (Tinsley et al, 1998, Nat Med. 4: 1441-1444).

**[0107]** Recientes investigaciones demuestran que el bloqueo o eliminación de la función de GDF8 (un ligando de ActRIIB) in vivo pueden tratar con eficacia al menos ciertos síntomas en los pacientes con DMD y BMD. Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB objeto 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 con DMD y BMD. Este enfoque se confirma y está apoyado por los datos mostrados en el presente documento, mediante los cuales se mostró que una proteína ActRIIB-Fc inducía la expresión amplia en el sarcolema de la utrofina, ya que aumenta la masa muscular y la fuerza en un modelo de ratón de la distrofia muscular.

## 7. Composiciones farmacéuticas

**[0108]** En ciertos casos, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) de la presente descripción se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto se pueden formular para administración de cualquier manera conveniente para usar en medicina humana o veterinaria.

**[0109]** En ciertos casos, el procedimiento terapéutico de la descripción incluye administrar la composición tópicamente, sistémicamente, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para usar en esta invención está, naturalmente, en una forma libre de pirógenos, fisiológicamente aceptable. Además, la composición deseablemente puede encapsularse o inyectarse en una forma viscosa para la liberación a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo, un sitio que tiene un daño tisular. La administración tópica puede ser adecuada para la curación de heridas y reparación de tejidos. Agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos ActRIIB que pueden también opcionalmente estar incluidos en la composición, tal como se han descrito anteriormente, pueden, alternativa o adicionalmente, administrarse simultáneamente o secuencialmente con los compuestos objeto (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) en los procedimientos de la descripción.

**[0110]** En ciertos casos, las composiciones de la presente descripción pueden incluir una matriz capaz de liberar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) a un sitio de tejido diana, proporcionando una estructura para el desarrollo de tejido y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIB. Dichas matrices pueden estar formadas de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

**[0111]** La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y químicamente definidas de sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices están compuestas de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y

químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos, u otros cerámicos. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de materiales anteriormente mencionados, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos pueden alterarse en su composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato, y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y la biodegradabilidad.

[0112] En ciertos casos, los procedimientos de la descripción se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o de agua-en-aceite, o como un elixir o jarabe, o como grageas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

[0113] En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos de la presente descripción con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, 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 acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden también comprender agentes amortiguadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes, tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

[0114] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino, y de sésamo), glicerol, tetrahidrofuril alcohol, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y agentes conservantes.

[0115] Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, tales como alcoholes de isoestearilo etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

[0116] Ciertas composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía tópica, a la piel o a membranas mucosas. Las formulaciones tópicas pueden incluir además uno o más de una amplia variedad de agentes conocidos por ser eficaces como potenciadores de la penetración de la piel o el estrato córneo. Ejemplos de éstos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, sulfóxido de dimetilo, y azona. Pueden incluirse además agentes adicionales para hacer que la formulación sea cosméticamente aceptable. Ejemplos de éstos son las grasas, ceras, aceites, colorantes, fragancias, conservantes, estabilizantes, y agentes activos de superficie. También pueden incluirse agentes queratolíticos, tales como los conocidos en la técnica. Ejemplos son el ácido salicílico y azufre.

[0117] Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón, o propelente que puedan ser necesarios. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto objeto de la descripción (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, derivados de aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de talco y zinc, o mezclas de los mismos.

[0118] Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un compuesto objeto, excipientes, tales como lactosa,

talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

**[0119]** En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRIIB en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de usarse, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción 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. La fluidez apropiada puede mantenerse, 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.

**[0120]** Las composiciones de la descripción también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

**[0121]** Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico asistente considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la descripción (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB). Los diversos factores dependerán de la enfermedad a tratar. En el caso de trastornos de los músculos, los factores pueden incluir, pero no se limitan a, la cantidad de masa muscular que se desea formar, los músculos más afectados por la enfermedad, la condición del músculo deteriorado, la edad, el sexo, y la dieta del paciente, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosificación. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación del músculo, por ejemplo, mediante un ensayo de resistencia, evaluación por MRI del tamaño del músculo y análisis de biopsias de músculo.

**[0122]** En ciertos casos de la descripción, uno o más polipéptidos ActRIIB se pueden administrar, juntos (simultáneamente) o en momentos diferentes (secuencialmente o de forma solapada). Además, los polipéptidos ActRIIB se pueden administrar con otro tipo de agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente inductor de cartílago, un agente inductor de hueso, un agente inductor de músculo o un agente inductor de la neurona o reductor de la grasa. Los dos tipos de compuestos se pueden administrar simultáneamente o en momentos diferentes. Se espera que los polipéptidos ActRIIB de la descripción puedan actuar en concierto con o quizás de forma sinérgica con otro agente terapéutico.

**[0123]** En un ejemplo específico, se ha descrito una variedad de factores osteogénicos inductores de cartílago e inductores de hueso, en particular bisfosfonatos. Véase, por ejemplo, las solicitudes de Patente Europea Nos. 148.155 y 169.016. Por ejemplo, otros factores que pueden combinarse con los polipéptidos ActRIIB objeto incluyen varios factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformante (TGF-alfa y TGF-beta), y factor de crecimiento insulínico (IGF).

**[0124]** En ciertos casos, la presente descripción también proporciona terapia génica para la producción in vivo de polipéptidos ActRIIB. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de ActRIIB en células o tejidos que tienen los trastornos indicados anteriormente. La liberación de secuencias de polinucleótidos de ActRIIB se puede lograr utilizando un vector de expresión recombinante, tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere para la liberación terapéutica de secuencias de polinucleótidos de ActRIIB, el uso de liposomas dirigidos.

**[0125]** Varios vectores víricos que pueden utilizarse para la terapia génica, tal como se enseña en este documento, incluyen adenovirus, virus herpes, vaccinia, o, preferiblemente, un virus de ARN, tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen exógeno incluyen, pero no se limitan a: virus de leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), y Virus del Sarcoma de Rous (RSV). Un número de vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que las células transducidas pueden ser identificadas y generadas. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana uniendo, por ejemplo, un

azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra usando un anticuerpo. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o se pueden unir a una envoltura viral para permitir la liberación específica de diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIB. En un caso preferido, el vector está dirigido a hueso, cartílago, músculo o células/tejidos de neuronas.

[0126] Alternativamente, las células de cultivo de tejido pueden ser transfectadas directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectan a continuación con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

[0127] Otro sistema de liberación dirigida para polinucleótidos ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, micropartículas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta descripción es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de liberación in vitro e in vivo. Se pueden encapsular ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y se pueden liberar a células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los procedimientos para la transferencia eficiente de genes utilizando un vehículo de liposoma son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, et al, Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden utilizar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

[0128] Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible en base a, por ejemplo, especificidad de órgano, especificidad de célula y especificidad de orgánulo y es conocido en la técnica.

#### EJEMPLIFICACIÓN

[0129] La invención descrita ahora de forma general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente para fines de ilustración de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

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

[0130] Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIB soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIB humano fusionado a un dominio Fc de ratón o humano con un enlazador mínimo (tres aminoácidos de glicina) en el medio. Las construcciones se denominan como ActRIIB (20-134)-hFc y ActRIIB (20-134)-mFc, respectivamente.

[0131] ActRIIB (20-134) -hFc se muestra a continuación como purificada a partir de líneas de células CHO (SEQ ID NO: 5)

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

```

[0132] Las proteínas ActRIIB (20-134)-hFc y ActRIIB (20-134)-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se

consideraron tres secuencias líder diferentes:

- (i) Melitina de abejas melíferas (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 7)
- (ii) activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 8)
- (iii) nativo: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 9).

[0133] La forma seleccionada emplea el líder TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE  
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE  
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSV  
LTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0134] Este polipéptido es codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 10):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT  
CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA  
ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA  
AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA  
AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG  
AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC  
ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG  
GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG  
TCTTCTCTT CCCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA  
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG  
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT  
ACCGTGTTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA  
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA  
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA  
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG  
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT  
CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG  
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA  
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0135] La secuenciación N-terminal del material producido por células CHO reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 11). Cabe destacar que otras construcciones descritas en la literatura comienzan con una secuencia de -SGR ....

[0136] La purificación se puede lograr 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 sefara, cromatografía de fenilsefara, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se pudo

completar con filtración vírica e intercambio de tampón.

[0137] Las proteínas de fusión ActRIIB-Fc también se expresaron en células HEK293 y células COS. Aunque el material de todas las líneas celulares y condiciones de cultivo razonables proporcionaron proteína con actividad de construcción muscular in vivo, se observó variabilidad en la potencia tal vez relacionada con la selección de la línea celular y/o condiciones de cultivo.

#### Ejemplo 2: Generación de mutanes de ActRIIB-Fc

[0138] 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 base tiene la secuencia (parte Fc subrayada) (SEQ ID NO: 12):

```

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP
TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

```

[0139] Se introdujeron varias mutaciones, incluyendo truncamientos N-terminales y C-terminales, en la proteína ActRIIB-Fc de base. Basándose en los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que estas construcciones, si se expresan con un líder TPA, carecerán de la serina N-terminal. Las mutaciones se generaron en el dominio extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Después de la PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, se digirieron con SfoI y AgeI y se purificaron en gel. Estos fragmentos se ligaron en el vector de expresión pAID4 (ver WO2006/012627) de manera que tras la ligadura se creó la quimera de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en DH5 alfa de E. coli, se recogieron las colonias y se aislaron los ADN. Para las construcciones murinas (mFc), se sustituyó una IgG2a murina por IgG1 humana. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

[0140] Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección transitoria. En resumen, en un centrífugador de 500 ml, las células HEK293T se establecieron a  $6 \times 10^5$  células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250 ml y supervisión. Al día siguiente, estas células se trataron con complejo ADN:PEI (1:1) a 0,5 ug/ml de concentración final de ADN. Después de 4 horas, se añadieron 250 ml de medio y se cultivaron las células durante 7 días. El medio acondicionado se recogió desacelerando las células en el centrífugador y se concentró.

[0141] Los mutantes se purificaron usando una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, columna de proteína A y se eluyeron con tampón de glicina de pH bajo (3,0). Después de la neutralización, se dializaron frente a PBS.

[0142] Los mutantes también se produjeron en células CHO mediante una metodología similar.

#### Ejemplo 3: Generación de variante truncada de ActRIIB (25-131)-hFc

[0143] Los solicitantes generaron una proteína de fusión truncada, ActRIIB (25-131)-hFc (**Figuras 7-8**), que muestra efectos sobre el músculo que son similares a los observados con ActRIIB (20-134)-hFc. Se generó ActRIIB (25-131)-hFc usando el mismo líder y la metodología descrita anteriormente con respecto a ActRIIB (20-134)-hFc. La proteína ActRIIB (25-131)-hFc madura purificada después de la expresión en células CHO tiene la secuencia mostrada a continuación (SEQ ID NO: 23):

ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
 KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPOVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ  
 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

#### Ejemplo 4: Efecto de ActRIIB-Fc sobre la masa muscular y la fuerza en ratones *mdx*

[0144] Con el fin de determinar la capacidad de ActRIIB (20-134)-Fc para aumentar la masa muscular en un estado de la enfermedad, los solicitantes determinaron la capacidad de la proteína ActRIIB-Fc para aumentar la masa muscular en el modelo de ratón *mdx* de distrofia muscular.

[0145] Ratones *mdx* adultos fueron tratados dos veces/semana con proteína ActRIIB (20-134)-mFc (1,3, o 10 mg/kg; intraperitoneal) o un vehículo de control con PBS. Se mide la fuerza que un ratón ejerce cuando se tira de un transductor de fuerza para determinar la fuerza de agarre de la extremidad anterior. La fuerza media de cinco ensayos de tracción se utilizó para la comparación de la fuerza de agarre entre las cohortes. Al final del estudio, se diseccionaron los músculos femoral, gastrocnemio, pectoral y del diafragma y se pesaron. Las mediciones de la fuerza de agarre mostraron también un aumento significativo. Los resultados de la masa muscular se resumen en la tabla, a continuación.

**Pesos de tejido de ratones *mdx* tratados con vehículo y ActRIIB (20-134)-mFc**

| Tratado con vehículo                    | Gastrocnemio (L+R) | Femoral (L+R) | Pectoral (L+R) | Diafragma     |
|-----------------------------------------|--------------------|---------------|----------------|---------------|
| Promedio (gramos) ± desviación estándar | 0,413 ± 0,040      | 0,296 ± 0,019 | 0,437 ± 0,060  | 0,111 ± 0,030 |
| ActRIIB (20-134)-mFc (10 mg/kg)         | Gastrocnemio (L+R) | Femoral (L+R) | Pectoral (L+R) | Diafragma     |
| Promedio (gramos) ± desviación estándar | 0,52 ± 0,050       | 0,39 ± 0,05   | 0,807 ± 0,21   | 0,149 ± 0,020 |
| Valor p del ensayo                      | 0,0006             | 0,0006        | 0,002          | 0,05          |

[0146] Como se ilustra en la tabla, los grupos tratados con ActRIIB (20-134)-mFc muestran una mayor masa de tejido magro en los ratones *mdx* en comparación con los ratones tratados con PBS. El tratamiento con ActRIIB-Fc aumentó el tamaño del gastrocnemio un 25,9%, el tamaño del femoral un 31,8%, y los músculos pectorales un 85,4% en comparación con el grupo control del vehículo. De posible importancia clínica, también se encontró que los pesos del diafragma de ratones tratados con ActRIIB(20-134)-mFc aumentaron un 34,2% con respecto a la cohorte de control. Estos datos demuestran la eficacia de la proteína ActRIIB-Fc en un estado de la enfermedad distrofia muscular.

[0147] Además, los ratones *mdx* tratados con proteína ActRIIB-Fc mostraron una mayor fuerza de agarre en comparación con los controles tratados con vehículo. A las 16 semanas, los grupos de 1, 3 y 10 mg/kg de ActRIIB-Fc mostraron un 31,4%, 32,3% y 64,4% de aumento en la fuerza de agarre, respectivamente, en comparación con el grupo de control con vehículo. El rendimiento mejorado de la fuerza de agarre de los grupos tratados con ActRIIB (20-134)-mFc apoya la idea de que el aumento del músculo que se encuentra en los grupos de tratamiento es fisiológicamente relevante. Los ratones *mdx* son susceptibles de una lesión inducida contráctil y se someten significativamente a más ciclos de degeneración y

regeneración que sus homólogos de tipo natural. A pesar de estos fenotipos musculares, el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc aumenta la fuerza de agarre en los ratones *mdx*.

**[0148]** En la distrofia muscular de Duchenne, el inicio de la enfermedad se produce en la infancia temprana, a menudo tan pronto como a los cinco años. En consecuencia, los datos presentados anteriormente con respecto a ratones adultos no reflejan necesariamente los efectos que una molécula de ActRIIB tendría en niños con DMD. Para hacer frente a esto, se realizó un estudio con ratones *mdx* jóvenes.

**[0149]** El tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc aumenta significativamente el peso corporal en ratones C57BL/10 y *mdx* (cuatro semanas de vida). El análisis de composición corporal utilizando espectroscopía de RMN in vivo indicó un incremento de masa de tejido magro acompañado de pesos corporales más altos. Ratones C57BL/10 tratados con ActRIIB (20-134)-mFc ganaron un 35,2% de masa de tejido magro y el grupo *mdx* tratado ganó un 48,3% más de masa de tejido magro que sus respectivas cohortes de control. Además, se evaluó el efecto del tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc sobre la fuerza. Las puntuaciones de la fuerza de agarre de ratones *mdx* tratados con vehículo fueron 15,7% más bajas que la cohorte de C57BL/10 con vehículo, ilustrando así la debilidad muscular asociada con la deficiencia de distrofina. En cambio, los ratones *mdx* tratados con ActRIIB (20-134)-mFc mejoraron su fuerza de agarre en comparación con el grupo *mdx* con vehículo, y alcanzaron mediciones de fuerza de agarre que superó a la de los ratones C57BL/10 con vehículo y alcanzaron el nivel de las puntuaciones de fuerza de agarre para C57BL/10 tratados (*mdx* con vehículo:  $0,140 \pm 0,01$  Kgf; *mdx* tratados:  $0,199 \pm 0,02$  Kgf; C57BL/10 con vehículo:  $0,166 \pm 0,03$ ;  $0,205 \pm 0,02$  Kgf). Sorprendentemente, el tratamiento devolvió los ratones *mdx* jóvenes de nuevo a niveles de tipo natural de la fuerza de agarre. Por lo tanto, la molécula ActRIIB (20-134)-mFc es probable que tenga importantes aplicaciones clínicas en la distrofia muscular de Duchenne, particularmente en pacientes menores de edad a una edad más cerca del inicio de la enfermedad.

#### **Ejemplo 5: Efecto de ActRIIB-Fc en la expresión en sarcolema de utrofina en ratones *mdx***

**[0150]** Los tipos más comunes de distrofia muscular son causados por la pérdida parcial o completa de la proteína distrofina funcional, dando lugar a la fragilidad del sarcolema (membrana de la célula muscular), debilidad muscular y finalmente necrosis muscular. La utrofina es una proteína estructuralmente similar, aunque con una distribución altamente restringida en las fibras musculares maduras en condiciones normales. Existen pruebas convincentes que sugieren que la utrofina podría sustituir a la distrofina y así proporcionar beneficios terapéuticos en muchos pacientes con distrofia muscular si se puede diseñar un procedimiento para aumentar los niveles de utrofina a lo largo de todo el sarcolema de fibras musculares, como es el caso durante el desarrollo temprano (Miura et al., 2006, Trends Mol Med 12: 122-129).

**[0151]** Por lo tanto, los solicitantes investigaron la capacidad de ActRIIB (20-134)-mFc para aumentar los niveles de utrofina en todo el sarcolema de las fibras musculares en un modelo de ratón *mdx*<sup>5cv</sup>, en el que una mutación puntual en el exón 10 del gen de distrofina crea un codón de parada prematuro y la proteína distrofina disfuncional. Comenzando a los 4-6 meses de edad, ratones *mdx*<sup>5cv</sup> fueron tratados con ActRIIB (20-134)-mFc, 10 mg/kg, sc, o vehículo (solución salina tamponada con Tris) dos veces por semana durante 20 semanas. A la terminación de la dosificación, los músculos pectoral mayor y músculo extensor común de los dedos (EDL) se extrajeron y se congelaron para análisis posteriores.

**[0152]** Se investigaron los efectos de ActRIIB-Fc sobre la expresión de utrofina en el músculo mediante análisis de transferencia Western e inmunohistoquímica. En la preparación para el primero, se homogeneizaron mecánicamente músculos de pectoral mayor con un homogeneizador de tejidos soportado manualmente en presencia de inhibidores de proteasa y fosfatasa. Las muestras de proteína se desarrollaron en mini gel de 4-12% acrilamida NuPAGE® Novex® Tris (Invitrogen) y se transfirieron a membrana de fluoruro de polivinilideno Immobilon®-FL (Millipore). Se confirmaron la igualdad de carga de proteína entre los carriles y la transferencia de proteína uniforme a través de las membranas con tinción Ponceau antes de la inmunodetección. La utrofina unida a la membrana se detectó con un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra la utrofina humana recombinante (clon MANCHO3 8A4, diluido 1:200; Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa). Se ha observado que este anticuerpo reconoce la utrofina de ratón, así como homólogos de humano, perro y Xenopus. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (diluido 1:2000). La densitometría se realizó con un sistema Chemo Genius Bioimaging (Syngene), y los niveles de utrofina se normalizaron al nivel de GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) en cada muestra para controlar el procesamiento no uniforme. Para el análisis inmunohistoquímico, la utrofina se visualizó en secciones transversales fijadas en acetona (14 µm de espesor) de las fibras musculares EDL con un anticuerpo primario murino dirigido contra el extremo C-terminal de la utrofina humana (Santa Cruz Biotechnology, nº de catálogo. Sc-81556) y un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, nº de catálogo. A21121).

**[0153]** Estos enfoques complementarios produjeron una fuerte evidencia de que ActRIIB-Fc induce la expresión en el sarcolema de la utrofina en ratones *mdx*. Según la evaluación por transferencia Western, el tratamiento crónico con ActRIIB (20-134)-mFc en ratones *mdx* de edad media aumentó los niveles de proteína utrofina en más de un 80% en comparación con los controles cuando se promedió sobre todo el músculo pectoral (**Figura 9**). Además, el análisis inmunohistoquímico

de las fibras musculares EDL confirmó que el aumento en la expresión de la utrofina se localizó en el sarcolema. Como se muestra en las **Figuras 10-11**, la utrofina fue apenas detectable en la mayoría de los segmentos de sarcolema de ratones *mdx* tratados con vehículo, tal como se esperaba para las fibras musculares maduras de adultos *mdx*. En comparación con los controles, hubo un marcado aumento de los niveles de utrofina en sarcolema en ratones *mdx* de la misma edad tratados con ActRIIB (20-134)-mFc, con la utrofina ampliamente distribuida a lo largo del sarcolema de fibras individuales (**Figuras 10-11**). Estos resultados demuestran que el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc puede inducir de forma inesperada una amplia distribución en el sarcolema de la utrofina en las fibras musculares en un modelo de ratón de la distrofia muscular. Esta capacidad para inducir la utrofina, y potencialmente compensar la deficiencia de distrofina, indica que el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc puede mejorar la inestabilidad del sarcolema y el daño celular relacionado con la contracción, ya que aumenta el tamaño y la fuerza muscular. Por lo tanto, además de proporcionar a los pacientes un aumento de la masa muscular y de la fuerza, el tratamiento con antagonistas de la señalización de ActRIIB puede crear fibras musculares que son más resistentes a los daños y la degeneración que son típicos de la DMD y la BMD.

#### **Ejemplo 6: Efecto de ActRIIB-Fc en la integridad del sarcolema y caída de la fuerza con contracciones excéntricas en ratones *mdx***

[0154] Los solicitantes tratarán ratones *mdx*<sup>5cv</sup> con ActRIIB (20-134)-mFc o vehículo, tal como se describió anteriormente, para determinar si las propiedades inductoras de utrofina de ActRIIB-Fc protegen contra la inestabilidad del sarcolema y el daño muscular relacionado con la contracción en un modelo de ratón de la distrofia muscular. Además, los ratones de tipo natural que sirven como controles serán tratados con ActRIIB (20-134)-mFc o vehículo. Un ensayo trazador con colorante azul de Evan será utilizado para evaluar la permeabilidad del sarcolema dependiente del uso (como un indicador de integridad de la membrana) mediante la detección de la infiltración de albúmina de suero de plasma en fibras musculares. Los ratones en cada grupo se ejercerán regularmente en una cinta y a continuación se inyectarán IP con colorante azul de Evan esterilizado (50 µl de una solución tamponada de 10 mg/ml por 10 g de peso corporal) al final de la dosificación. Los músculos se escindirán veinte y cuatro horas más tarde y se congelarán inmediatamente en isopentano enfriado. Las secciones transversales se prepararán con un criostato y se procesarán para la visualización microscópica de la infiltración colorante de azul de Evan en fibras individuales. La tinción inmunohistoquímica para una proteína del sarcolema (tal como la laminina) se puede utilizar para confirmar o revelar límites del sarcolema, y puede cuantificarse el porcentaje de fibras totales que se infiltran por albúmina de suero (colorante azul de Evan). Los solicitantes esperan que el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc mejorará o prevendrá la infiltración de colorante azul de Evan en fibras musculares de ratones *mdx*<sup>5cv</sup> ejercitados, como una indicación de la mejora de la integridad del sarcolema.

[0155] En el ratón *mdx*, los músculos esqueléticos (en particular los músculos de contracción rápida) muestran una caída excesiva de la fuerza tetánica máxima después de una serie de contracciones excéntricas, durante las que las fibras musculares se alargan a medida que ejercen fuerza (contracción). Esta caída excesiva de la fuerza se ha atribuido a la lesión de la fibra dependiente de la contracción derivada de la alteración de un sarcolema deficiente en distrofina (Blaauw et al, 2008, Hum Mol Genet 17: 3686-3696). Por lo tanto, se estudiarán ratones *mdx* y controles de tipo natural adicionales para determinar si ActRIIB-Fc puede, a través de su capacidad inductora de utrofina, proporcionar resistencia al daño de la fibra mediada por contracciones excéntricas. En este experimento, ratones *mdx*<sup>5cv</sup> (o controles de tipo natural) se ejercerán en una cinta a intervalos regulares y se tratarán con ActRIIB (20-134)-mFc o vehículo, tal como se describe anteriormente. En el cese de la dosificación, los músculos que contiene principalmente fibras de contracción rápida (tales como EDL) se escindirán y se ensayarán según un protocolo ex vivo similar al de Krag et al, (2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 13856-13860). En breve, los músculos se pesarán y se unirán tanto a un micrómetro como a un transductor de fuerza dentro de un baño de órgano que contiene solución de Ringer oxigenado. La estimulación se realizará con electrodos de campo conectados a una unidad estimuladora. La caída de fuerza asociada con las contracciones excéntricas se calculará usando la diferencia de la generación de la fuerza isométrica durante el primer y vigésimo tétano de un protocolo estándar. Al final del ensayo fisiológico, los músculos serán congelados rápidamente en isopentano enfriado para el análisis histológico posterior. Los solicitantes esperan que el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc reducirá la caída de la fuerza asociada con las contracciones excéntricas, como una indicación de la reducción de la fragilidad del sarcolema.

#### **Ejemplo 7: Efecto de ActRIIB-Fc en el daño muscular inducido por el ejercicio en ratones *mdx***

[0156] Los solicitantes investigaron la capacidad de ActRIIB (20-134)-mFc de combatir o invertir el daño muscular inducido por ejercicio en un modelo de ratón *mdx*<sup>5cv</sup>. Se dividieron ratones *mdx* de cinco semanas de vida en cuatro grupos (N=10 para cada grupo). El primer grupo no se le hizo ninguna intervención, se sacrificó después de cuatro semanas y se evaluaron los niveles de creatina quinasa en suero. Al segundo grupo se le dio ejercicios en cinta y se sacrificaron después de cuatro semanas. Al tercer grupo se le dio ejercicio en cinta durante ocho semanas, con el tratamiento con vehículo (TBS) administrado desde la cuarta semana hasta la octava semana. Al cuarto grupo se le dio ejercicio en cinta durante ocho semanas, con tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) administrado desde la semana cuatro a la ocho.

[0157] Los niveles de creatina quinasa en suero se muestran para cada grupo en la Figura 12. El tratamiento con ActRIIB-Fc previno completamente el daño inducido por el ejercicio (medido por los niveles de creatina quinasa en suero) resultantes después de la cuarta semana, y por otra parte, invirtió el daño que aparece antes de la cuarta semana (compárese el grupo 2 frente al grupo 4). En consecuencia, ActRIIB-Fc previene y revierte el daño a las fibras musculares en un modelo de ratón de la distrofia muscular de Duchenne, consistente con los otros hallazgos en este documento con respecto al aumento de los niveles de utrofina.

[0158] Aunque se han discutido realizaciones específicas de la materia, la memoria anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes. El alcance completo de la invención debe ser determinado por referencia a las reivindicaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### [0159]

<110> Acceleron Pharma Inc.

<120> PROTEÍNAS ACTRIIB Y VARIANTES Y USOS DE LAS MISMAS CON RESPECTO A LA INDUCCIÓN DE UTOFINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA MUSCULAR

<130> P38771EP-PCT

<140> EP10832122.5

<141> 2010-11-17

<150> US 61/331,686

<151> 2010-05-05

<150> US 61/318,126

<151> 2010-03-26

<150> US 61/281,386

<151> 2009-11-17

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

# ES 2 658 292 T3

Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln  
 65 70 75 80  
 5 Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr  
 85 90 95  
 10 His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro  
 100 105 110  
 Thr Ala Pro Thr  
 115  
 15  
 <210> 2  
 <211> 512  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp  
 1 5 10 15  
 25 Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
 20 25 30  
 30 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
 35 35 40 45  
 35 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
 50 55 60  
 40 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  
 45 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
 100 105 110  
 50 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
 115 120 125  
 55 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 60 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 2 658 292 T3

|    | 165 |            |            |            |            |            |            |            | 170        |            |            |            | 175        |            |            |            |
|----|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  | Gly | Pro        | Pro        | Pro<br>180 | Pro        | Ser        | Pro        | Leu        | Val<br>185 | Gly        | Leu        | Lys        | Pro        | Leu<br>190 | Gln        | Leu        |
| 10 | Leu | Glu        | Ile<br>195 | Lys        | Ala        | Arg        | Gly        | Arg<br>200 | Phe        | Gly        | Cys        | Val        | Trp<br>205 | Lys        | Ala        | Gln        |
| 15 | Leu | Met<br>210 | Asn        | Asp        | Phe        | Val        | Ala<br>215 | Val        | Lys        | Ile        | Phe        | Pro<br>220 | Leu        | Gln        | Asp        | Lys        |
| 20 | Gln | Ser        | Trp        | Gln        | Ser        | Glu<br>230 | Arg        | Glu        | Ile        | Phe        | Ser<br>235 | Thr        | Pro        | Gly        | Met        | Lys<br>240 |
| 25 | His | Glu        | Asn        | Leu        | Leu<br>245 | Gln        | Phe        | Ile        | Ala        | Ala<br>250 | Glu        | Lys        | Arg        | Gly        | Ser<br>255 | Asn        |
| 30 | Leu | Glu        | Val        | Glu<br>260 | Leu        | Trp        | Leu        | Ile        | Thr<br>265 | Ala        | Phe        | His        | Asp        | Lys<br>270 | Gly        | Ser        |
| 35 | Leu | Thr        | Asp<br>275 | Tyr        | Leu        | Lys        | Gly        | Asn<br>280 | Ile        | Ile        | Thr        | Trp        | Asn<br>285 | Glu        | Leu        | Cys        |
| 40 | His | Val<br>290 | Ala        | Glu        | Thr        | Met        | Ser<br>295 | Arg        | Gly        | Leu        | Ser        | Tyr<br>300 | Leu        | His        | Glu        | Asp        |
| 45 | Val | Pro        | Trp        | Cys        | Arg        | Gly<br>310 | Glu        | Gly        | His        | Lys        | Pro<br>315 | Ser        | Ile        | Ala        | His        | Arg<br>320 |
| 50 | Asp | Phe        | Lys        | Ser        | Lys<br>325 | Asn        | Val        | Leu        | Leu        | Lys<br>330 | Ser        | Asp        | Leu        | Thr        | Ala<br>335 | Val        |
| 55 | Leu | Ala        | Asp        | Phe<br>340 | Gly        | Leu        | Ala        | Val        | Arg<br>345 | Phe        | Glu        | Pro        | Gly        | Lys<br>350 | Pro        | Pro        |
| 60 | Gly | Asp        | Thr<br>355 | His        | Gly        | Gln        | Val        | Gly<br>360 | Thr        | Arg        | Arg        | Tyr        | Met<br>365 | Ala        | Pro        | Glu        |
| 65 | Val | Leu        | Glu        | Gly        | Ala        | Ile        | Asn<br>375 | Phe        | Gln        | Arg        | Asp        | Ala<br>380 | Phe        | Leu        | Arg        | Ile        |
| 70 | Asp | Met        | Tyr        | Ala        | Met        | Gly<br>390 | Leu        | Val        | Leu        | Trp        | Glu<br>395 | Leu        | Val        | Ser        | Arg        | Cys<br>400 |
| 75 | Lys | Ala        | Ala        | Asp        | Gly<br>405 | Pro        | Val        | Asp        | Glu        | Tyr<br>410 | Met        | Leu        | Pro        | Phe        | Glu<br>415 | Glu        |

# ES 2 658 292 T3

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

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

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

15 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

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

25 <210> 3  
<211> 348  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

30 <400> 3  
tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgcaa ctgggagctg 60  
gagcgcacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120  
35 tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180  
ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtggtgtg ccactgagga gaacccccag 240  
gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca tttgccagag 300  
40 gctggggggc cggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc 348

45 <210> 4  
<211> 1539  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

50 <400> 4  
atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60  
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcatt tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120  
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gactgctac 180  
55 gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatt gagctcgtga agaagggtg ctggctagat 240  
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccaggtgtac 300  
60 ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgttca ctattttgcc agaggctggg 360  
ggcccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420

|    |                                                                            |         |
|----|----------------------------------------------------------------------------|---------|
|    | tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac          | 480     |
|    | cggcatcgca agcccccta cggtcattgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca          | 540     |
| 5  | ccatcccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggagc          | 600     |
|    | tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca          | 660     |
| 10 | ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag           | 720     |
|    | cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag          | 780     |
|    | ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac          | 840     |
| 15 | atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac          | 900     |
|    | ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg          | 960     |
| 20 | gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt          | 1020    |
|    | ggcttggtgctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc        | 1080    |
|    | acgagacggt acatggctcc tgagggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc         | 1140    |
| 25 | ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc          | 1200    |
|    | aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag          | 1260    |
| 30 | cacccttcgt tggaggagct gcaggagggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt         | 1320    |
|    | aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc            | 1380    |
|    | tgggacctg atgcagaggc tcgcttgctc gcgggtgtg tggaggagcg ggtgtccctg            | 1440    |
| 35 | attcggagggt cgggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc        | 1500    |
|    | accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa                                  | 1539    |
| 40 | <210> 5<br><211> 343<br><212> PRT<br><213> Secuencia artificial            |         |
| 45 | <220><br><223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético  |         |
|    | <400> 5<br>Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn |         |
| 50 | 1                                                                          | 5 10 15 |
|    | Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly            |         |
| 55 | 20                                                                         | 25 30   |
|    | Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser            |         |
| 60 | 35                                                                         | 40 45   |
|    | Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn            |         |
|    | 50                                                                         | 55 60   |

# ES 2 658 292 T3

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 5 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
 85 90 95  
 10 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
 100 105 110  
 15 Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 115 120 125  
 20 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  
 25 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 165 170 175  
 30 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 180 185 190  
 35 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 195 200 205  
 40 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  
 45 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 245 250 255  
 50 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 260 265 270  
 55 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 275 280 285  
 60 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<br>325 | Glu | Ala | Leu | His | Asn<br>330 | His | Tyr | Thr | Gln | Lys<br>335 | Ser |  |
| 5  |                                            |                                                                       |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | Leu                                        | Ser                                                                   | Leu | Ser | Pro        | Gly | Lys |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <div style="text-align: center;">340</div> |                                                                       |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 10 | <210>                                      | 6                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <211>                                      | 5                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <212>                                      | PRT                                                                   |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <213>                                      | Secuencia artificial                                                  |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 15 | <220>                                      |                                                                       |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <223>                                      | Descripción de secuencia artificial: péptido sintético                |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <400>                                      | 6                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 20 | Thr                                        | Gly                                                                   | Gly | Gly | Gly        |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | 1                                          |                                                                       |     |     |            | 5   |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 25 | <210>                                      | 7                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <211>                                      | 21                                                                    |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <212>                                      | PRT                                                                   |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <213>                                      | Desconocido                                                           |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <220>                                      |                                                                       |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 30 | <223>                                      | Descripción de desconocido: péptido de melitina de abejas mielíferas  |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <400>                                      | 7                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | Met                                        | Lys                                                                   | Phe | Leu | Val        | Asn | Val | Ala | Leu | Val        | Phe | Met | Val | Val | Tyr        | Ile |  |
| 35 | 1                                          |                                                                       |     |     | 5          |     |     |     |     |            | 10  |     |     |     | 15         |     |  |
|    | Ser                                        | Tyr                                                                   | Ile | Tyr | Ala        |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    |                                            |                                                                       |     |     | 20         |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 40 | <210>                                      | 8                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <211>                                      | 22                                                                    |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <212>                                      | PRT                                                                   |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <213>                                      | Desconocido                                                           |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 45 | <220>                                      |                                                                       |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <223>                                      | Descripción de Desconocido: péptido activador de plasminógeno tisular |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <400>                                      | 8                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 50 | Met                                        | Asp                                                                   | Ala | Met | Lys        | Arg | Gly | Leu | Cys | Cys        | Val | Leu | Leu | Leu | Cys        | Gly |  |
|    | 1                                          |                                                                       |     |     | 5          |     |     |     |     |            | 10  |     |     |     | 15         |     |  |
| 55 | Ala                                        | Val                                                                   | Phe | Val | Ser        | Pro |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    |                                            |                                                                       |     |     | 20         |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <210>                                      | 9                                                                     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <211>                                      | 20                                                                    |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
| 60 | <212>                                      | PRT                                                                   |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <213>                                      | Desconocido                                                           |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |
|    | <220>                                      |                                                                       |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |  |

<223> Descripción de desconocido: péptido líder nativo

<400> 9

5 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

10

<210> 10

<211> 1107

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

20 <400> 10

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60

tcgcccggcg cctctgggagc tggggagggt gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc 120

25 aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180

aagcggctgc actgctacgc ctcttgccgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240

30 aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300

gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360

catttgccag aggttggggg cccggaagtc acgtacgagc caccctccgac agccccacc 420

35 ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480

gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgagggtc 540

40 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720

45 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcgc agaaaaccat ctccaaagcc 780

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 840

50 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900

gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960

tccgacggct ctttcttctt ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020

55 gggAACgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080

agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

60 <210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 11  
Gly Arg Gly Glu Ala Glu  
1 5

10 <210> 12  
<211> 344  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 12  
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala  
20 1 5 10 15

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

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser  
30 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 658 292 T3

|    | 180                                                              | 185 | 190 |
|----|------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  |     |     |
|    | 195                                                              | 200 | 205 |
| 10 | Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  |     |     |
|    | 210                                                              | 215 | 220 |
| 15 | Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  |     |     |
|    | 225                                                              | 230 | 235 |
| 20 | Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  |     |     |
|    | 245                                                              | 250 | 255 |
| 25 | Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  |     |     |
|    | 260                                                              | 265 | 270 |
| 30 | Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  |     |     |
|    | 275                                                              | 280 | 285 |
| 35 | Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  |     |     |
|    | 290                                                              | 295 | 300 |
| 40 | Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  |     |     |
|    | 305                                                              | 310 | 315 |
| 45 | Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  |     |     |
|    | 325                                                              | 330 | 335 |
| 50 | Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                                  |     |     |
|    | 340                                                              |     |     |
| 45 | <210> 13                                                         |     |     |
|    | <211> 225                                                        |     |     |
|    | <212> PRT                                                        |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial                                       |     |     |
| 50 | <220>                                                            |     |     |
|    | <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético |     |     |
| 55 | <220>                                                            |     |     |
|    | <221> MOD_RES                                                    |     |     |
|    | <222> (43)..(43)                                                 |     |     |
|    | <223> Asp o Ala                                                  |     |     |
| 60 | <220>                                                            |     |     |
|    | <221> MOD_RES                                                    |     |     |
|    | <222> (100)..(100)                                               |     |     |
|    | <223> Lys o Ala                                                  |     |     |
|    | <220>                                                            |     |     |

<221> MOD\_RES  
<222> (212)..(212)  
<223> Asn o Ala

5 <400> 13  
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
1 5 10 15

10 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
20 25 30

15 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp  
35 40 45

20 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
50 55 60

25 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
65 70 75 80

30 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
85 90 95

35 Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys  
100 105 110

40 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
115 120 125

45 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
130 135 140

50 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
145 150 155 160

55 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
165 170 175

60 Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
180 185 190

65 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
195 200 205

70 Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
210 215 220

75 Lys  
225

5 <210> 14  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 10 <400> 14  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
  
 15 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
  
 20 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
  
 25 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
  
 30 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
  
 35 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
  
 40 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
 100 105 110  
  
 45 Lys Pro Pro Thr  
 115  
  
 50 <210> 15  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Rattus sp.  
  
 55 <400> 15  
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1 5 10 15  
  
 60 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
 20 25 30  
  
 65 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
 35 40 45  
  
 70 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro  
 50 55 60  
  
 75 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 41

# ES 2 658 292 T3

|    | 65                |                    | 70                 |                    | 75                |                    | 80                 |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
|----|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----|
| 5  | Asp               | Phe                | Asn                | Cys                | Tyr <sub>85</sub> | Asp                | Arg                | Gln                | Glu                | Cys <sub>90</sub> | Val | Ala                | Thr                | Glu                | Glu <sub>95</sub> | Asn |
| 10 | Pro               | Gln                | Val                | Tyr <sub>100</sub> | Phe               | Cys                | Cys                | Cys                | Glu <sub>105</sub> | Gly               | Asn | Phe                | Cys                | Asn <sub>110</sub> | Glu               | Arg |
| 15 | Phe               | Thr                | His <sub>115</sub> | Leu                | Pro               | Glu                | Pro                | Gly <sub>120</sub> | Gly                | Pro               | Glu | Val                | Thr <sub>125</sub> | Tyr                | Glu               | Pro |
| 20 | Pro               | Pro <sub>130</sub> | Thr                | Ala                | Pro               | Thr                | Leu <sub>135</sub> | Leu                | Thr                | Val               | Leu | Ala <sub>140</sub> | Tyr                | Ser                | Leu               | Leu |
| 25 | Pro               | Ile                | Gly                | Gly                | Leu               | Ser <sub>150</sub> |                    |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
| 30 | <210>             | 16                 |                    |                    |                   |                    |                    |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
|    | <211>             | 150                |                    |                    |                   |                    |                    |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
|    | <212>             | PRT                |                    |                    |                   |                    |                    |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
|    | <213>             | Sus sp.            |                    |                    |                   |                    |                    |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
| 35 | <400>             | 16                 |                    |                    |                   |                    |                    |                    |                    |                   |     |                    |                    |                    |                   |     |
|    | Met               | Thr                | Ala                | Pro                | Trp <sub>5</sub>  | Ala                | Ala                | Leu                | Ala <sub>10</sub>  | Leu               | Leu | Trp                | Gly                | Ser                | Leu <sub>15</sub> | Cys |
| 40 | Val               | Gly                | Ser                | Gly <sub>20</sub>  | Arg               | Gly                | Glu                | Ala <sub>25</sub>  | Glu                | Thr               | Arg | Glu                | Cys                | Ile <sub>30</sub>  | Tyr               | Tyr |
| 45 | Asn               | Ala                | Asn <sub>35</sub>  | Trp                | Glu               | Leu                | Glu                | Arg <sub>40</sub>  | Thr                | Asn               | Gln | Ser                | Gly <sub>45</sub>  | Leu                | Glu               | Arg |
| 50 | Cys               | Glu <sub>50</sub>  | Gly                | Glu                | Gln               | Asp                | Lys <sub>55</sub>  | Arg                | Leu                | His               | Cys | Tyr <sub>60</sub>  | Ala                | Ser                | Trp               | Arg |
| 55 | Asn <sub>65</sub> | Ser                | Ser                | Gly                | Thr               | Ile <sub>70</sub>  | Glu                | Leu                | Val                | Lys <sub>75</sub> | Lys | Gly                | Cys                | Trp                | Leu <sub>80</sub> | Asp |
| 60 | Asp               | Phe                | Asn                | Cys                | Tyr <sub>85</sub> | Asp                | Arg                | Gln                | Glu                | Cys <sub>90</sub> | Val | Ala                | Thr                | Glu                | Glu <sub>95</sub> | Asn |
|    | Pro               | Gln                | Val                | Tyr <sub>100</sub> | Phe               | Cys                | Cys                | Cys                | Glu <sub>105</sub> | Gly               | Asn | Phe                | Cys                | Asn <sub>110</sub> | Glu               | Arg |
|    | Phe               | Thr                | His <sub>115</sub> | Leu                | Pro               | Glu                | Ala                | Gly <sub>120</sub> | Gly                | Pro               | Glu | Val                | Thr <sub>125</sub> | Tyr                | Glu               | Pro |
|    | Pro               | Pro <sub>130</sub> | Thr                | Ala                | Pro               | Thr                | Leu <sub>135</sub> | Leu                | Thr                | Val               | Leu | Ala <sub>140</sub> | Tyr                | Ser                | Leu               | Leu |

Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
145 150

5

<210> 17  
<211> 150  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

10

<400> 17  
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
1 5 10 15

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
145 150

<210> 18  
<211> 150  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60

<400> 18  
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

# ES 2 658 292 T3

|    | 20                                                                                   | 25 | 30 |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| 5  | Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg<br>35 40 45          |    |    |
| 10 | Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg<br>50 55 60          |    |    |
| 15 | Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp<br>65 70 75 80       |    |    |
| 20 | Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn<br>85 90 95          |    |    |
| 25 | Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg<br>100 105 110       |    |    |
| 30 | Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro<br>115 120 125       |    |    |
| 35 | Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu<br>130 135 140       |    |    |
| 40 | Pro Ile Gly Gly Leu Ser<br>145 150                                                   |    |    |
| 45 | <210> 19<br><211> 150<br><212> PRT<br><213> Desconocido                              |    |    |
| 50 | <220><br><223> Descripción de Desconocido: polipéptido ActRIIb bovino                |    |    |
| 55 | <400> 19<br>Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Trp Gly Ser Leu Cys<br>1 5 10 15 |    |    |
| 60 | Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr<br>20 25 30          |    |    |
| 65 | Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg<br>35 40 45          |    |    |
| 70 | Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg<br>50 55 60          |    |    |
| 75 | Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp<br>65 70 75 80       |    |    |

# ES 2 658 292 T3

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
 85 90 95  
 5 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
 100 105 110  
 10 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
 115 120 125  
 15 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 20 Pro Val Gly Gly Leu Ser  
 145 150  
 <210> 20  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 25 <213> Xenopus sp.  
 <400> 20  
 Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe  
 1 5 10 15  
 30 Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr  
 20 25 30  
 35 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu  
 35 40 45  
 40 Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser  
 50 55 60  
 45 Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp  
 65 70 75 80  
 50 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  
 55 Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro  
 115 120 125  
 60 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

5 <210> 21  
<211> 150  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 21  
Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys  
1 5 10 15

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  
20 35 40 45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp  
25 50 55 60

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

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

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

40 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  
45 130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile  
145 150

50 <210> 22  
<211> 154  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido de consenso sintético

60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Thr, Ala, o no está presente

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (121)..(121)  
 5 <223> Pro, Ala, Val, o Met  
  
 <400> 22  
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu  
 1 5 10 15  
 10 Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr  
 20 25 30  
 15 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 20 Arg Leu Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser  
 50 55 60  
 25 Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp  
 65 70 75 80  
 30 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu  
 85 90 95  
 35 Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn  
 100 105 110  
 40 Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr  
 115 120 125  
 45 Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr  
 130 135 140  
 50 Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met  
 145 150  
  
 <210> 23  
 <211> 335  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético  
 55  
 <400> 23  
 Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 60 Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg  
 20 25 30

# ES 2 658 292 T3

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

[illegible]

1

5 <210> 28  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: Etiqueta 6xHis sintética

<400> 28  
 His His His His His His  
 1 5

15 <210> 29  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

25 <400> 29  
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

30 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr  
 20 25 30

35 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

45 Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys  
 85 90 95

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

55 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

60 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 145 150 155 160

# ES 2 658 292 T3

Val Phe Leu Phe Pro<sub>165</sub> Pro Lys Pro Lys Asp<sub>170</sub> Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 5  
 Thr Pro Glu Val<sub>180</sub> Thr Cys Val Val Val<sub>185</sub> Asp Val Ser His Glu<sub>190</sub> Asp Pro  
 10  
 Glu Val Lys<sub>195</sub> Phe Asn Trp Tyr Val<sub>200</sub> Asp Gly Val Glu Val<sub>205</sub> His Asn Ala  
 15  
 Lys Thr<sub>210</sub> Lys Pro Arg Glu Glu<sub>215</sub> Gln Tyr Asn Ser Thr<sub>220</sub> Tyr Arg Val Val  
 20  
 Ser Val<sub>225</sub> Leu Thr Val<sub>230</sub> Leu His Gln Asp Trp Leu<sub>235</sub> Asn Gly Lys Glu Tyr<sub>240</sub>  
 25  
 Lys Cys Lys Val<sub>245</sub> Ser Asn Lys Ala Leu Pro<sub>250</sub> Val Pro Ile Glu Lys<sub>255</sub> Thr  
 30  
 Ile Ser Lys Ala<sub>260</sub> Lys Gly Gln Pro Arg<sub>265</sub> Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 35  
 Pro Pro Ser<sub>275</sub> Arg Glu Glu Met Thr<sub>280</sub> Lys Asn Gln Val Ser<sub>285</sub> Leu Thr Cys  
 40  
 Leu Val<sub>290</sub> Lys Gly Phe Tyr Pro<sub>295</sub> Ser Asp Ile Ala Val<sub>300</sub> Glu Trp Glu Ser  
 45  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn<sub>310</sub> Asn Tyr Lys Thr Thr<sub>315</sub> Pro Pro Val Leu Asp<sub>320</sub>  
 Ser Asp Gly Ser Phe<sub>325</sub> Phe Leu Tyr Ser Lys<sub>330</sub> Leu Thr Val Asp Lys<sub>335</sub> Ser  
 50  
 Arg Trp Gln Gln<sub>340</sub> Gly Asn Val Phe Ser<sub>345</sub> Cys Ser Val Met His<sub>350</sub> Glu Ala  
 55  
 Leu His Asn<sub>355</sub> His Tyr Thr Gln Lys<sub>360</sub> Ser Leu Ser Leu Ser<sub>365</sub> Pro Gly Lys  
 60  
 <210> 30  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 30  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1 5 10 15

# ES 2 658 292 T3

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
 20 25 30  
 5 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 10 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 15 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 20 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  
 25 Ala Pro Thr  
 115  
 30 <210> 31  
 <211> 360  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético  
 <400> 31  
 40 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 Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr  
 20 25 30  
 45 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 50 Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp  
 50 55 60  
 55 Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu  
 65 70 75 80  
 60 Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu  
 85 90 95  
 Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu

# ES 2 658 292 T3

|    |     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |  |  |
|----|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|
|    |     |            |            | 100        |            |            |            |            | 105        |            |            |            |            |            | 110        |            |  |  |
| 5  | Arg | Phe        | Thr<br>115 | His        | Leu        | Pro        | Glu        | Ala<br>120 | Gly        | Gly        | Pro        | Glu        | Val<br>125 | Thr        | Tyr        | Glu        |  |  |
| 10 | Pro | Pro<br>130 | Pro        | Thr        | Gly        | Gly        | Gly<br>135 | Thr        | His        | Thr        | Cys        | Pro<br>140 | Pro        | Cys        | Pro        | Ala        |  |  |
| 15 | Pro | Glu        | Leu        | Leu        | Gly        | Gly<br>150 | Pro        | Ser        | Val        | Phe        | Leu<br>155 | Phe        | Pro        | Pro        | Lys        | Pro<br>160 |  |  |
| 20 | Lys | Asp        | Thr        | Leu        | Met<br>165 | Ile        | Ser        | Arg        | Thr        | Pro<br>170 | Glu        | Val        | Thr        | Cys        | Val<br>175 | Val        |  |  |
| 25 | Val | Asp        | Val        | Ser<br>180 | His        | Glu        | Asp        | Pro        | Glu<br>185 | Val        | Lys        | Phe        | Asn        | Trp<br>190 | Tyr        | Val        |  |  |
| 30 | Asp | Gly        | Val<br>195 | Glu        | Val        | His        | Asn        | Ala<br>200 | Lys        | Thr        | Lys        | Pro        | Arg<br>205 | Glu        | Glu        | Gln        |  |  |
| 35 | Tyr | Asn<br>210 | Ser        | Thr        | Tyr        | Arg        | Val<br>215 | Val        | Ser        | Val        | Leu        | Thr<br>220 | Val        | Leu        | His        | Gln        |  |  |
| 40 | Asp | Trp        | Leu        | Asn        | Gly        | Lys<br>230 | Glu        | Tyr        | Lys        | Cys        | Lys<br>235 | Val        | Ser        | Asn        | Lys        | Ala<br>240 |  |  |
| 45 | Leu | Pro        | Ala        | Pro        | Ile<br>245 | Glu        | Lys        | Thr        | Ile        | Ser<br>250 | Lys        | Ala        | Lys        | Gly        | Gln<br>255 | Pro        |  |  |
| 50 | Arg | Glu        | Pro        | Gln<br>260 | Val        | Tyr        | Thr        | Leu        | Pro<br>265 | Pro        | Ser        | Arg        | Glu        | Glu<br>270 | Met        | Thr        |  |  |
| 55 | Lys | Asn        | Gln<br>275 | Val        | Ser        | Leu        | Thr        | Cys<br>280 | Leu        | Val        | Lys        | Gly        | Phe<br>285 | Tyr        | Pro        | Ser        |  |  |
| 60 | Asp | Ile<br>290 | Ala        | Val        | Glu        | Trp        | Glu<br>295 | Ser        | Asn        | Gly        | Gln        | Pro<br>300 | Glu        | Asn        | Asn        | Tyr        |  |  |
| 65 | Lys | Thr        | Thr        | Pro        | Pro        | Val<br>310 | Leu        | Asp        | Ser        | Asp        | Gly<br>315 | Ser        | Phe        | Phe        | Leu        | Tyr<br>320 |  |  |
| 70 | Ser | Lys        | Leu        | Thr        | Val<br>325 | Asp        | Lys        | Ser        | Arg        | Trp<br>330 | Gln        | Gln        | Gly        | Asn        | Val<br>335 | Phe        |  |  |
| 75 | Ser | Cys        | Ser        | Val<br>340 | Met        | His        | Glu        | Ala        | Leu<br>345 | His        | Asn        | His        | Tyr        | Thr<br>350 | Gln        | Lys        |  |  |

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
355 360

5 <210> 32  
<211> 1083  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (73)..(396)

<400> 32

20 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60  
tcgcccggcg cc gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg 111  
Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp  
1 5 10

25 gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag 159  
Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu  
15 20 25

30 cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc 207  
Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly  
30 35 40 45

35 acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc 255  
Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys  
50 55 60

40 tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac 303  
Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr  
65 70 75

45 ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg 351  
Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu  
80 85 90

cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca 396  
Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
95 100 105

50 ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456  
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 516  
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 576

55 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 636  
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 696  
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 756

60 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 816  
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 876

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936  
tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996  
5 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1056  
agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083

10  
<210> 33  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15  
<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

20  
<400> 33  
Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu  
1 5 10 15

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

30  
Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu  
35 40 45

35  
Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg  
50 55 60

40  
Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys  
65 70 75 80

45  
Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala  
85 90 95

45  
Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
100 105

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en:
  - a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2; y
  - b. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el complemento del ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, para usar en el tratamiento de un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker (BMD) que tiene un elevado marcador para la degeneración muscular en relación con la norma para pacientes con el mismo estado de la enfermedad.
2. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:
  - a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2; y
  - b. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el complemento del ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, para la fabricación de un medicamento para tratar un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker (BMD) que tiene un elevado marcador para la degeneración muscular en relación con la norma para pacientes con el mismo estado de la enfermedad.
3. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en:
  - a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2; y
  - b. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el complemento del ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, para usar, según la reivindicación 1, para aumentar la integridad de las fibras musculares en un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker (BMD), en el que el paciente tiene un nivel de un marcador para la degeneración muscular que es elevado en relación con la norma para pacientes con el mismo estado de la enfermedad.
4. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:
  - a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2; y
  - b. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el complemento del ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, para la fabricación de un medicamento, según la reivindicación 1, para aumentar la integridad de las fibras musculares en un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker (BMD), en el que el paciente tiene un nivel de un marcador para la degeneración muscular que es elevado en relación con la norma para pacientes con el mismo estado de la enfermedad.
5. Compuesto para usar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el uso, según la reivindicación 2 o la reivindicación 4, en el que el compuesto aumenta la resistencia del sarcolema de las fibras musculares en dicho paciente.
6. Compuesto para usar, según con la reivindicación 5, o el uso según la reivindicación 5, en el que el compuesto aumenta la expresión de utrofina en músculo esquelético o cardíaco.
7. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 o 6, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 o 6, en el que el marcador de la degeneración muscular es CK-MM en suero.
8. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-7, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-7, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende además una parte heteróloga a ActRIIB.
9. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-8, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-8, en el que el polipéptido es un dímero.
10. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-9, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-9, en el que el polipéptido está fusionado a un dominio constante de una inmunoglobulina.
11. Compuesto para usar, según la reivindicación 10, o el uso, según la reivindicación 10, en el que el polipéptido está fusionado a una parte Fc de una inmunoglobulina.

12. Compuesto para usar, según la reivindicación 11, o el uso, según la reivindicación 11, en el que la inmunoglobulina es una IgG1 humana.
- 5 13. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, al menos 97%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2.
- 10 14. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2.
- 15 15. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 2.
16. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 2.
- 20 17. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- 25 18. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.
- 30 19. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-12, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-12, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 23.
20. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-19, o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-19, en el que el polipéptido se une a GDF8, GDF-11 o activina A.

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC  
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

Figura 1

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTN****Q****SGLERCEGEQDKRLHC**  
**YASWRN****S****SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE**  
**AGGPEVTYEPPTAPT**LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG  
 PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST  
 PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETMS  
 RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPPGKPPGD  
 THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP  
 FEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG  
 CVEERVSLIRRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Figura 2

tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaa  
ccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgactgctacgcctcctggcgcaaca  
gctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggag  
tgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgctt  
cactcatttgccagaggctgggggcccgggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccacc

Figura 3

atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtctctgggcgtggggagggc  
tgagacacggggagtgcattactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagc  
gctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgag  
ctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgagga  
gaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcaactcatttgccagagg  
ctgggggccccggaagtacgtacgagccacccccgacagccccaccctgctcacgggtgctggcctactca  
ctgctgcccacgggggcctttccctcatcgctcctgctggccttttgatgtaccggcatcgcaagcccc  
ctacggtcattgtggacatccatgaggaccctgggcctccaccaccatccccctctggtgggcctgaagccac  
tgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtctggaaggcccagctcatgaatgacttt  
gtagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcagagtgaacgggagatcttcagcacacc  
tggcatgaagcacgagaacctgctacagttcattgctgcccagagaagcgaggctccaacctcgaagtagagc  
tgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattacctaagggggaacatcatcacatgg  
aacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctcatacctgcatgaggatgtgcctgggtg  
ccgtggcgagggccacaagccgtctattgcccacagggaactttaaagtaagaatgtattgctgaagagcg  
acctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcgatttgagccagggaaacctccaggggacacc  
cacggacaggtaggcacgagacgggtacatggctcctgagggtgctcgagggagccatcaacttccagagaga  
tgccttctcgccattgacatgtatgccatgggggttggtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctg  
cagacggacccgtggatgagtacatgctgccctttgaggaagagattggccagcacccttcgcttgaggag  
ctgcaggaggtgggtgggtgcacaagaagatgaggcccaccattaaagatcactgggttgaaacacccgggcct  
ggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgtgtgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgcggtgtg  
tggaggagcggtgtccctgattcgagggtcgggtcaacggcactacctcggaactgtctcgcttccctgggtg  
acctctgtcaccaatgtggacctgccccctaaagagtcaagcatctaa

Figura 4

|         |            |            |                   |            |                    |
|---------|------------|------------|-------------------|------------|--------------------|
| ActRIIa | ILGRSETQEC | IFFNANWEKD | RINQTGVETPC       | YGDKDEPRRC | FATWKNISGS         |
| ActRIIb | GRGEAETREC | IYYNANWELE | <u>RTNQ</u> SLERC | EGEQDKRLHC | YASWRN <u>SSGT</u> |
|         | IEIVNQGCWL | DDINCYDRTD | CVEKKDSPEV        | YFCCCEGNMC | NEKFSYFPFM         |
|         | IELVKKGCWL | DDFNCDRQE  | CVATEENPQV        | YFCCCEGNFC | NERFTHLPEA         |
|         | EVTQPTSNPV | TEKPPT     |                   |            |                    |
|         | GGPEVTYEPP | PTAPT      |                   |            |                    |

Figura 5

|            |   |     |     |     |     |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|            |   | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Rat:ib     | M | A   | A   | A   | L   | L   | L   | G | L | O | A | G | G | G | A | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Pig:ib     | M | A   | A   | A   | L   | L   | L   | G | L | O | A | G | G | G | A | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Mouse:ib   | M | A   | A   | A   | L   | L   | L   | G | L | O | A | G | G | G | A | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Human:ib   | M | A   | A   | A   | L   | L   | L   | G | L | O | A | G | G | G | A | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Bovine:ib  | M | A   | A   | A   | L   | L   | L   | G | L | O | A | G | G | G | A | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Xenopus:ib | M | G   | A   | A   | L   | L   | L   | L | A | L | A | G | G | G | V | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Human:IA   | M | G   | A   | A   | L   | L   | L   | L | A | L | A | G | G | G | V | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
| Consensus  | M | A   | A   | A   | L   | L   | L   | G | L | O | A | G | G | G | A | R | C | I | L | A | A | L | R | T | N | G | D | L | R | C | G | A | R |
|            |   | 60  | 70  | 80  | 90  | 100 | 110 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Rat:ib     | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Pig:ib     | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Mouse:ib   | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Human:ib   | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Bovine:ib  | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Xenopus:ib | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Human:IA   | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| Consensus  | L | H   | C   | A   | R   | N   | G   | I | L | S | G | G | L | L | C | R | D | G | A | L | I | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
|            |   | 120 | 130 | 140 | 150 |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Rat:ib     | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pig:ib     | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Mouse:ib   | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Human:ib   | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Bovine:ib  | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Xenopus:ib | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Human:IA   | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Consensus  | H | L   | F   | A   | G   | G   | V   | - | - | - | A | L | L | V | L | A | L | L | I | G | G | L | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

Rat: Rata  
 Pig: Cerdo  
 Mouse: Ratón  
 Human: Humano  
 Bovine: Bovino  
 Xenopus: Xenopus  
 Consensus: Consenso

Figura 6

```

1  MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51  EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFHW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK

```

Figura 7

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                               A E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101  ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151  GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG
   CTTCCGCTCG TCCTGTTTCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGGTTGTG

S G T I E L V K K G C W L D D F
201  CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
   GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251  ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301  TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

P E A G G P E V T Y E P P P T
351  GCCAGAGGCT GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401  GTGGAAC TCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGAATTGA GGACCCCCCT

451  CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501  CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551  CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601  AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651  CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701  GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTCGCG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

```

Figura 8

```

751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801  CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901  GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951  CTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACCTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT

```

**Figura 8**  
**continuación**

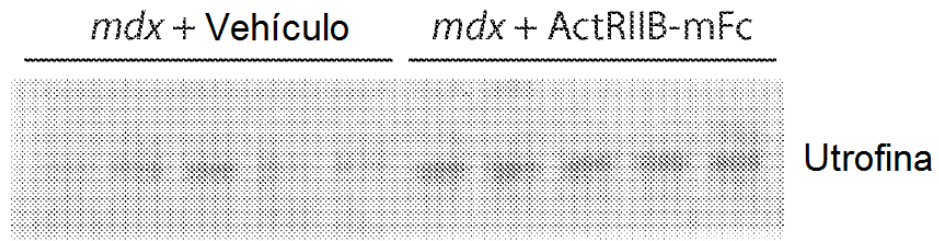


Figura 9A

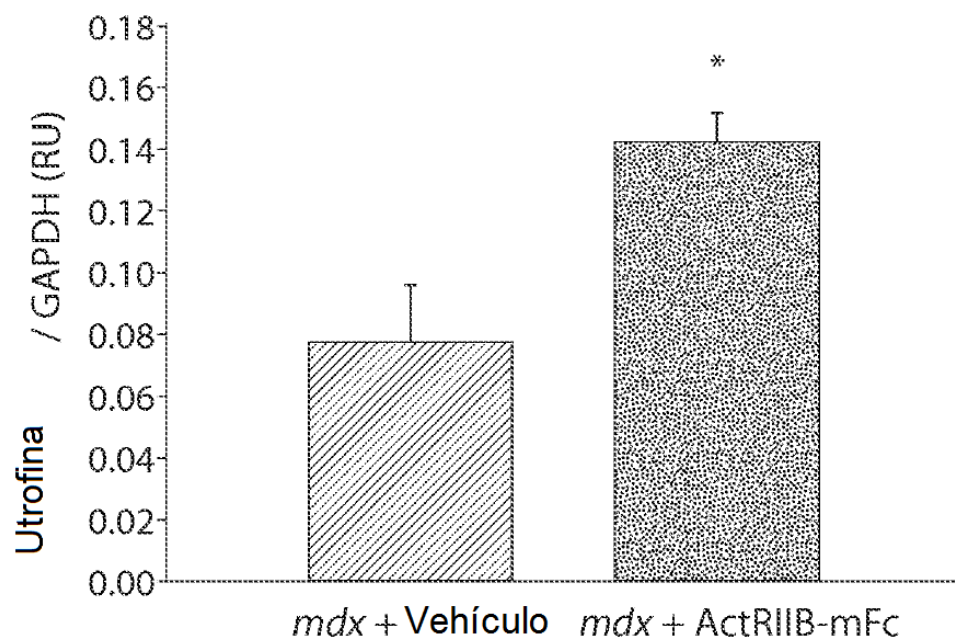
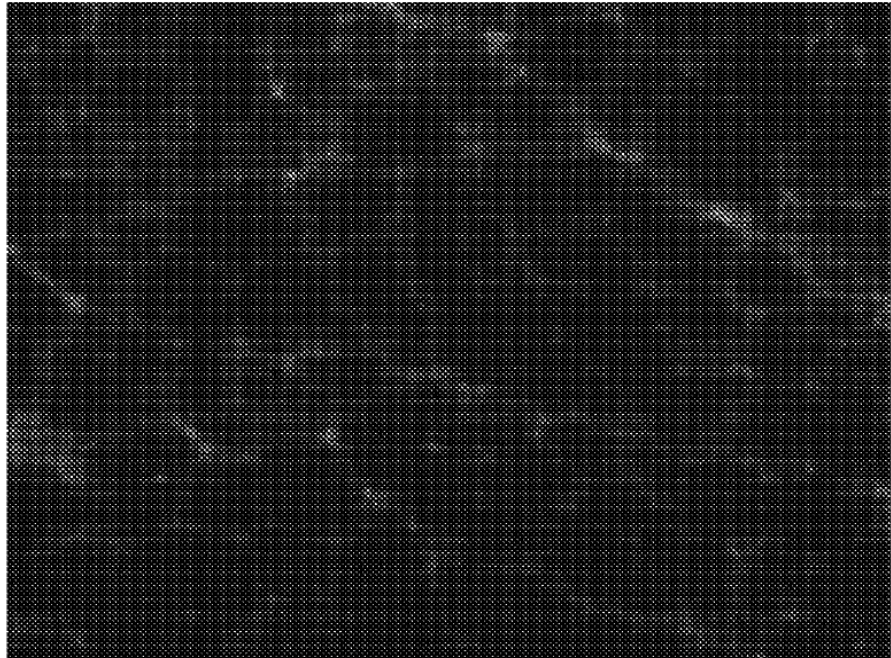


Figura 9B

A  
*mdx* +  
Vehículo



B  
*mdx* +  
ActRIIB-mFc

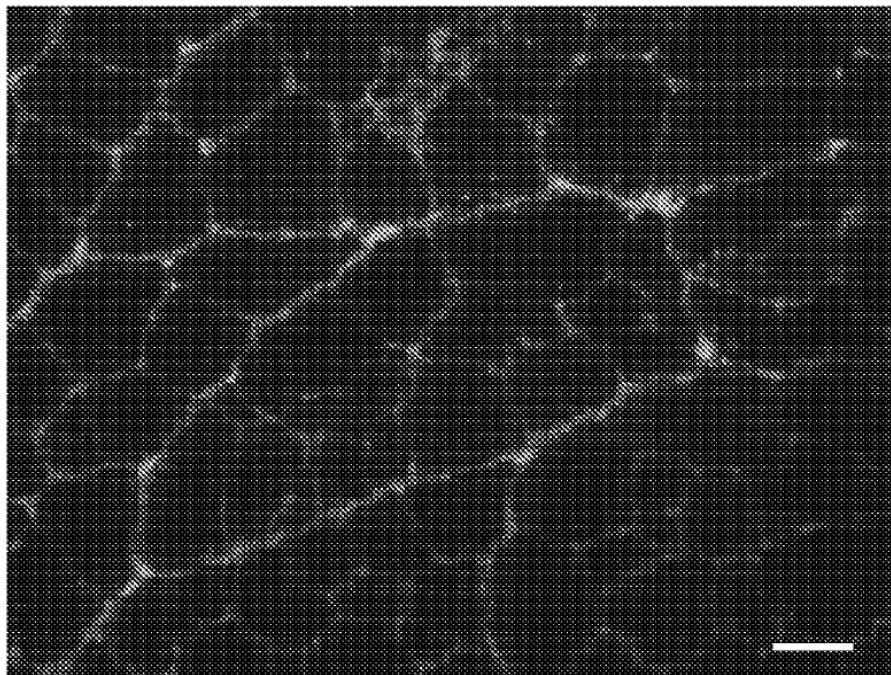
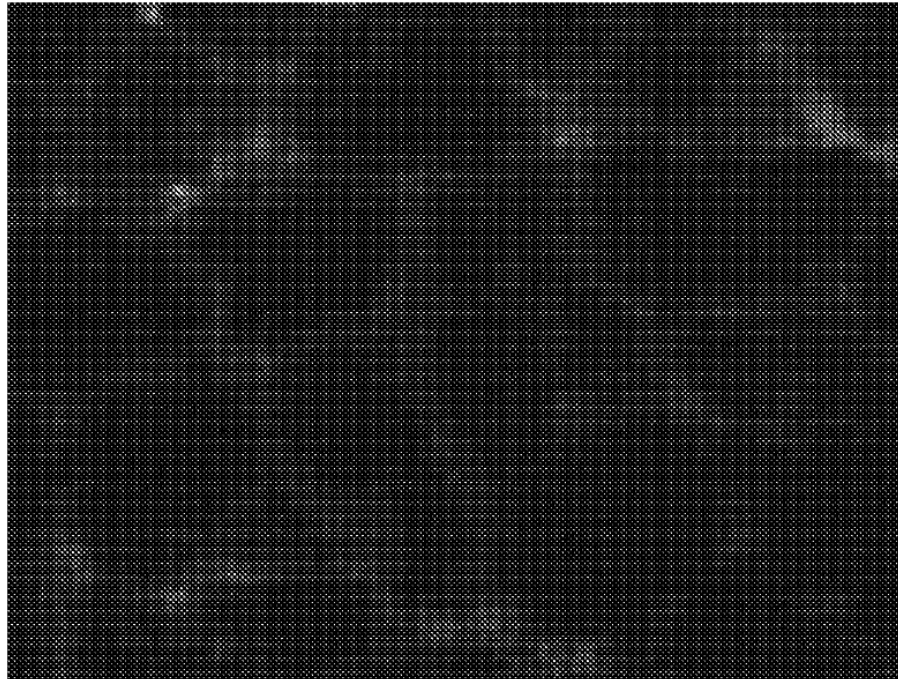


Figura 10

A

*mdx* +  
Vehículo



B

*mdx* +  
ActRIIB-mFc

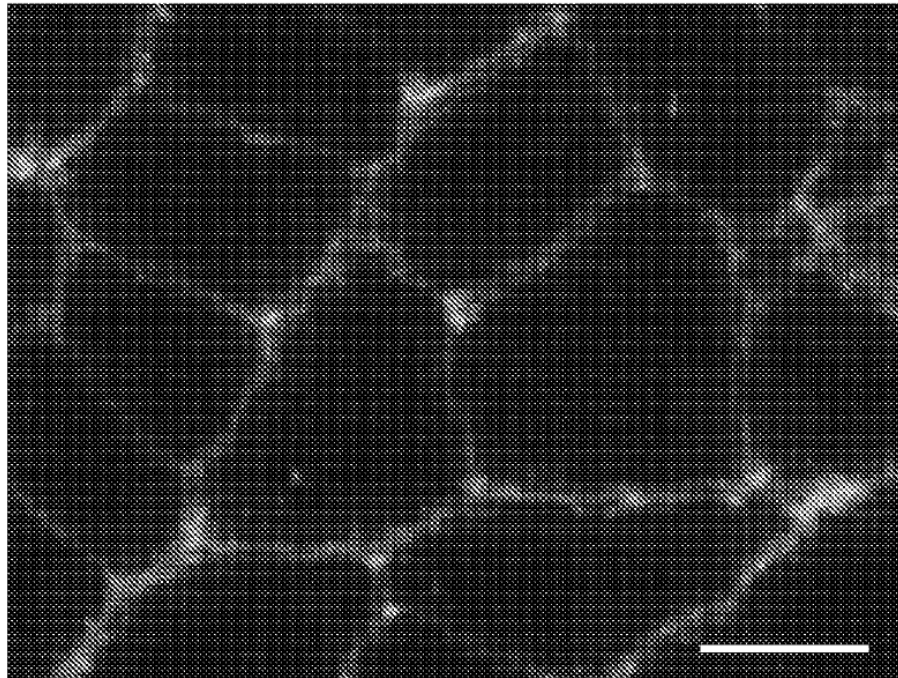


Figura 11

