

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 710**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2014 PCT/US2014/012996**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14116981**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2014 E 14706362 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2948161**

54 Título: **Folistatina en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

25.01.2013 US 201361756996 P
13.12.2013 US 201361915733 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2019

73 Titular/es:

SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.
(100.0%)
300 Shire Way
Lexington MA 02421, US

72 Inventor/es:

MINEAU, ROCHELLE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 715 710 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

Folistatina en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne

5 ANTECEDENTES

10 [0001] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una forma recesiva de distrofia muscular ligada al X, que resulta en la degeneración muscular y la muerte final. El trastorno es causado por una mutación en el gen de la distrofina, ubicada en el cromosoma X humano, que codifica la proteína distrofina, un componente estructural importante dentro del tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al complejo distroglicano (DGC) de la membrana celular. La distrofina une la red de filamentos de actina citoplásmica interna y la matriz extracelular, proporcionando fuerza física a las fibras musculares. En consecuencia, la alteración o ausencia de distrofina da como resultado una función anormal de la membrana sarcolémica. Mientras que las personas de ambos sexos pueden portar la mutación, los varones suelen tener un fenotipo grave con discapacidad y mortalidad tempranas, mientras que las mujeres que portan una mutación suelen mostrar un fenotipo mucho más leve.

20 [0002] Actualmente, no existe una cura conocida para la DMD. Se han investigado muchas vías terapéuticas, incluida la terapia génica y diversos protocolos de administración de corticosteroides. Si bien algunos de estos tratamientos pueden retrasar ciertos signos y síntomas, actualmente no existe una opción terapéutica satisfactoria para los pacientes con DMD. Los documentos WO 2009/158025 A2, WO 2009/158015 A2, WO 2011/031901 A1 y WO 2005/033134 A2 analizan las proteínas de fusión de folistatina para uso en el tratamiento de la distrofia muscular.

25 SUMARIO DE LA INVENCION

30 [0003] La invención es como se define en las presentes reivindicaciones. En el presente documento se describen, entre otras cosas, métodos y composiciones mejoradas para el tratamiento de la distrofia muscular, en particular, la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y/o la distrofia muscular de Becker, basadas en la terapia con proteínas de folistatina. Como se describe en el presente documento, incluso en los ejemplos a continuación, los presentes inventores demostraron, por primera vez, que la administración sistémica de una proteína de folistatina recombinante (es decir, una proteína de fusión de folistatina-Fc recombinante) en un modelo animal de DMD dio como resultado un crecimiento muscular eficaz en varios tejidos en todo el cuerpo y reducción de la fibrosis muscular y/o necrosis, síntomas característicos de la DMD. Además, los presentes inventores también han demostrado que las proteínas de fusión de folistatina-Fc de acuerdo con la presente invención tienen una vida media en suero prolongada de hasta aproximadamente 5 días. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se contempla que la vida media en suero inesperadamente larga puede haber contribuido a la eficacia *in vivo* superior. De hecho, antes de la presente invención, se sabía que la folistatina era un modulador de la miostatina y la activina, los cuales son importantes reguladores negativos del crecimiento muscular. Sin embargo, antes de la presente invención, se informó que la folistatina tiene una vida media en suero particularmente corta, lo que constituyó un obstáculo importante para el desarrollo de la folistatina como proteína terapéutica. Por ejemplo, una proteína de folistatina de tipo salvaje (FS315) típica disponible comercialmente tiene una vida media en suero de aproximadamente una hora. La proteína de fusión Fc se había utilizado para prolongar la vida media en suero de la folistatina. Sin embargo, debido al gran tamaño del dominio Fc y el tamaño relativamente más pequeño de la proteína folistatina, se pensó que una fusión directa del dominio Fc con la proteína folistatina puede interferir con la estructura y función normal de una proteína de folistatina de tipo salvaje. Las propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) informadas de la folistatina y la incertidumbre asociadas con la proteína de fusión folistatina-Fc desalentaron a los científicos y clínicos a seguir desarrollando la folistatina como una terapia de proteínas para la DMD u otra distrofia muscular. De hecho, antes de la presente invención, la terapia génica ha sido el foco de la terapia basada en folistatina para la DMD. La eficacia *in vivo* inesperadamente superior y vida media mostrada por los presentes inventores establece por primera vez que la folistatina puede ser una proteína terapéutica eficaz para el tratamiento de la DMD. La presente invención proporciona una proteína de folistatina recombinante para su uso en un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en donde el método comprende administrar a un individuo que sufre o es susceptible de DMD una cantidad efectiva de una proteína de folistatina recombinante que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 o 2 fusionada a un dominio Fc a través de un enlazador peptídico que comprende 10 o más aminoácidos de manera que al menos un síntoma o característica de la DMD se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene un inicio retardado, y en el que el enlazador peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7. La presente invención también proporciona una proteína de fusión de folistatina recombinante que comprende un polipéptido de folistatina; un dominio Fc; y un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc, en el que el polipéptido de folistatina comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2; en donde el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7; y además, en donde la proteína de fusión de folistatina recombinante es capaz de unirse a activina, miostatina y/o GDF-11 y tiene una vida media *in vivo* que varía de 0,5-10 días.

65 [0004] En el presente documento se describen métodos para tratar la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que incluyen administrar a un individuo que sufre o es susceptible a la DMD una cantidad efectiva de una proteína de

folistatina recombinante tal que al menos un síntoma o característica de la DMD se reduzca en intensidad, severidad, o frecuencia, o ha retrasado el inicio. En algunas realizaciones, al menos un síntoma o característica de la DMD se selecciona del grupo que consiste en desgaste muscular, debilidad muscular, fragilidad muscular, contractura articular, deformación esquelética, infiltración grasa del músculo, reemplazo del músculo con tejido no contráctil (p. ej., fibrosis muscular), necrosis muscular, cardiomiopatía, dificultad para tragar, función alterada del intestino y la vejiga, isquemia muscular, función cognitiva (p. ej., dificultades de aprendizaje, mayor riesgo de trastornos del comportamiento, disfunción conductual, deterioro de la socialización, escoliosis y deterioro de la función respiratoria).

10 **[0005]** La proteína de folistatina humana de tipo salvaje tiene la siguiente secuencia:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMIFNGGAP
 15 NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
 20 VGRGRCSLDELCPDSKSDPEVPCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNSIS
 EDTEEEEEDEDQDYSPFISSILEW (SEQ ID NO:1).

25 **[0006]** En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante comprende una eliminación de los residuos de aminoácidos 212-288 de SEQ ID NO: 1 (que corresponde al dominio

3):GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMIFNGGA
 30 PNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCSISEDTEEEEEDEDQDYSPFISSI
 35 LEW (SEQ ID NO:2).

40 **[0007]** En algunas realizaciones, al menos un síntoma o característica de DMD se selecciona del grupo que consiste en pérdida de masa muscular, debilidad muscular, la fragilidad muscular, hipertrofia muscular, pseudohipertrofia muscular, contractura de la articulación, deformación esquelética, cardiomiopatía, trastornos de la deglución, alteración de la función intestinal y vesical, isquemia muscular, deterioro cognitivo, disfunción del comportamiento, deterioro social, escoliosis y deterioro de la función respiratoria.

45 **[0008]** La proteína folistatina recombinante de la invención se fusiona a un dominio Fc. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado para la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50% (p. ej., al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntico a

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 50 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 55 (SEQ ID NO:3); o

KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 60 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 65 4); o

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 5 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 10 NO: 14).

[0009] En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 3, 4, o 14. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 3, 4 o 14. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a la SEQ ID NO: 3, 4 o 14.

[0010] En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones que mejoran la unión entre el dominio Fc y el receptor FcRn resultante en prolongada vida media en suero. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 y/o Asn 434 de IgG1 humana. En realizaciones particulares, un dominio Fc adecuado contiene mutaciones H433K (His433Lys) y/o N434F (Asn434Phe). En realizaciones particulares, un dominio Fc adecuado comprende una secuencia mostrada a continuación que incorpora las mutaciones de H433K (His433Lys) y N434F (Asn434Phe):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 30 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:15).

[0011] La proteína folistatina recombinante de la invención se fusiona con el dominio Fc a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador es un péptido que comprende 100 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador no es un enlazador que consiste en ALEV-LFQGP. El enlazador comprende al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 aminoácidos y una secuencia idéntica a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (enlazador GAG, SEQ ID NO: 5); GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (enlazador GAG2, SEQ ID NO: 6) o

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGG
 45 GAP (enlazador GAG3, SEQ ID NO: 7).

[0012] Una proteína de fusión de folistatina recombinante de la invención incluye un polipéptido de folistatina, un dominio Fc, y un enlazador con una longitud de al menos 10 (p. ej., al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95) aminoácidos que asocian el polipéptido de folistatina con el dominio Fc. Una proteína de fusión de folistatina recombinante de la invención incluye un polipéptido de folistatina, un dominio Fc y un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc, en donde el enlazador no es un enlazador que consiste en ALEVLFQGP. En algunas realizaciones, el polipéptido de folistatina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos 100% idéntica a la proteína de folistatina humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1). La proteína de fusión de folistatina recombinante es capaz de unirse a activina, miostatina y/o GDF-11 y tiene una vida media in vivo que varía de aproximadamente 0.5-10 días.

[0013] En realizaciones particulares, una proteína de folistatina recombinante adecuada para la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a SEQ ID NO: 8

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNEC
ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
10 VGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
EDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWVWAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
15 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
20 LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8),

0
25 SEQ ID NO: 9

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNEC
30 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
VGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
35 EDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWVWAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
40 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
45 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9).

[0014] En realizaciones particulares, una proteína de folistatina recombinante adecuada para la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a SEQ ID NO: 10

50 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNEC
ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
55 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILE
LEWVWAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
GGGGAPKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
60 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65 0 (SEQ ID NO:10),

SEQ ID NO: 11

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
 NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASS
 10 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCISISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI
 LEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
 GGGGAPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 15 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK (SEQ ID NO: 11).

20 **[0015]** En realizaciones particulares, una proteína de folistatina recombinante adecuada para la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a

25 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
 NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASS
 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
 30 VGRGRCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
 EDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
 GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 35 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

40 O

45 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
 NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASS
 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
 50 VGRGRCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
 EDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
 GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 55 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
 HEALKFHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

60 **[0016]** En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante adecuada para la presente invención se produce a partir de células de mamíferos. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células humanas. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO) o células HT1080.

65 **[0017]** Se apreciará que las realizaciones de la invención pueden administrarse mediante una variedad de rutas. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra sistémicamente. En algunas

realizaciones, la administración sistémica se selecciona de la administración intravenosa, intradérmica, inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea, intramuscular, oral y/o transmucosa.

5 **[0018]** Las realizaciones pueden administrarse a través de una multiplicidad de regímenes de dosificación. En algunas formas de realización, la proteína de folistatina recombinante se administra bimestralmente, mensualmente, trimestralmente, quincenalmente, semanalmente, diariamente o en intervalos variables.

10 **[0019]** En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra a uno o más tejidos diana seleccionados de músculo estriado (p. ej., músculo esquelético, músculo cardíaco). En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra al corazón. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra al músculo esquelético. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra a uno o más músculos esqueléticos seleccionados de la Tabla 1. En algunas realizaciones, el músculo estriado (p. ej., músculo esquelético) se selecciona del grupo que consiste en tríceps, tibial anterior, sóleo, gastrocnemio, bíceps, trapecio, deltoides, cuádriceps y diafragma.

15 **[0020]** En algunas realizaciones, los resultados de proteína de folistatina recombinantes en la regeneración muscular, reducción de la fibrosis, aumento de la fuerza muscular, aumento de la flexibilidad, aumento del rango de movimiento, aumento del aguante, reducción de la fatiga, aumento del flujo sanguíneo, mejora de la cognición, mejora de la función pulmonar, inhibición de la inflamación, reducción de la fibrosis muscular y/o necrosis.

20 **[0021]** La presente invención proporciona composiciones para su uso en un método de tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una proteína de fusión de folistatina recombinante que incluye un polipéptido de folistatina, un dominio Fc y un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc, en donde el polipéptido de folistatina comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el péptido enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, o 7, y además en el que, la proteína de fusión folistatina recombinante es capaz de unirse a activinas, la miostatina y/o GDF-11 y tiene una vida media *in vivo* que oscila entre unos 0,5-10 días. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de folistatina recombinante tiene una vida media *in vivo* que varía de aproximadamente 2-10 días (p. ej., que varía de aproximadamente 2,5-10 días, de aproximadamente 3-10 días, de aproximadamente 3,5-10 días, de aproximadamente 4-10 días, desde aproximadamente 4,5-10 días, desde aproximadamente 5-10 días, desde aproximadamente 3-8 días, desde aproximadamente 3,5-8 días, desde aproximadamente 4-8 días, desde aproximadamente 4,5-8 días, desde aproximadamente 5-8 días, de aproximadamente 3-6 días, de aproximadamente 3,5-6 días, de aproximadamente 4-6 días, de aproximadamente 4,5-6 días, de aproximadamente 5-6 días). En algunas realizaciones, la vida media *in vivo* se mide en uno o más de ratones, ratas, primates no humanos y/o humanos. En algunas realizaciones, el polipéptido de folistatina contiene una eliminación de los residuos de aminoácidos 212-288 de la SEQ ID. NO: 1 (que corresponde al dominio 3). El polipéptido de folistatina contiene el sitio de unión al sulfato de heparina.

40 **[0022]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una proteína de fusión folistatina recombinante que incluye un polipéptido de la folistatina, un dominio Fc, y un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc, en el que el polipéptido de folistatina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWWMIFNGGAP NCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNEC ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
45 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCISEDTEEEEDQDYSPFISSI LEW (SEQ ID NO: 2), y en donde el péptido enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, o 7, y además en el que, la proteína de fusión folistatina recombinante es capaz de unirse a activinas, miostatina y/o GDF-11 y tiene una vida media *in vivo* que oscila entre aproximadamente 0,5-10 días. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de folistatina recombinante tiene una vida media *in vivo* que varía de aproximadamente 2-10 días (p. ej., que varía de aproximadamente 2,5-10 días, de aproximadamente 3-10 días, de aproximadamente 3,5-10 días, de aproximadamente 4-10 días, desde aproximadamente 4,5-10 días, desde aproximadamente 5-10 días, desde aproximadamente 3-8 días, desde aproximadamente 3,5-8 días, desde aproximadamente 4-8 días, desde aproximadamente 4,5-8 días, desde aproximadamente 5-8 días, de aproximadamente 3-6 días, de aproximadamente 3,5-6 días, de aproximadamente 4-6 días, de aproximadamente 4,5-6 días, de aproximadamente 5-6 días). En algunas realizaciones, la vida media *in vivo* se mide en uno o más de ratones, ratas, primates no humanos y/o humanos.

50 **[0023]** En algunas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En algunas realizaciones, el dominio Fc tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50% (p. ej., al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntica a

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

5
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 10
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:3); o

15
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 20
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 4); o

25
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 30
 VLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 14).

35 **[0024]** En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones que mejoran la unión
 entre el dominio Fc y el receptor FcRn resultante en vida media prolongada en suero. En algunas realizaciones, el
 dominio Fc comprende una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Thr 250, Met 252, Ser
 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 y/o Asn 434 de IgG1 humana. En realizaciones particulares, un
 dominio Fc adecuado contiene mutaciones H433K (His433Lys) y/o N434F (Asn434Phe). En realizaciones
 40
 particulares, un dominio Fc adecuado comprende una secuencia mostrada a continuación que incorpora las
 mutaciones de H433K (His433Lys) y N434F (Asn434Phe):

45
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 50
 VLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:15).

55 **[0025]** Una proteína de fusión folistatina recombinante de acuerdo con la presente invención incluye un enlazador de
 tal manera que la fusión Fc mediante el enlazador no cambia sustancialmente las propiedades de unión de la
 folistatina a ligandos afines, incluyendo el mantenimiento de la ausencia de unión a la heparina. En algunas
 realizaciones, el enlazador es un péptido que comprende 60 aminoácidos. El conector es un péptido que comprende
 al menos 10 (p. ej., al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95) amino ácidos y una
 60
 secuencia idéntica a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (enlazador GAG, SEQ ID NO: 5);

65

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (enlazador GAG2, SEQ ID NO: 6);

o

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGG
GAP (enlazador GAG3, SEQ ID NO:7).

[0026] En realizaciones particulares, una proteína de fusión folistatina recombinante puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos 50% (p. ej., al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntica a la SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 16 o 17:

[0027] La presente invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de folistatina recombinante de la presente invención. La presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de folistatina recombinante de la presente invención. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de folistatina recombinante de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0028] Como se usa en esta solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se utilizan como equivalentes. Cualquier número utilizado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente está destinado a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE DIBUJO.

[0029] Los dibujos son sólo para fines ilustrativos no para limitación.

FIG. 1 muestra resultados ejemplares que ilustran que FS315-Fc no inhibe la señalización de BMP-9 o BMP-10 a través de Smad 1/5/8 en comparación con un receptor de activina soluble comercialmente disponible (sActRIIB). FIG. 1A muestra resultados ejemplares del ensayo de inhibición de BMP-9 y la FIG. 1B muestra resultados ejemplares del ensayo de inhibición de BMP-10.

FIG. 2 muestra resultados ejemplares que ilustran que FS315-Fc inhibe la señalización Smad 2/3 mediada por miostatina y activina. FIG. 2A muestra resultados ejemplares del ensayo de inhibición de miostatina y FIG.2B muestra resultados ejemplares de un ensayo de inhibición de activina A.

FIG. 3 muestra resultados ejemplares que ilustran el perfil de PK a través de tejidos. Una proteína de folistatina-Fc ejemplar tiene una vida media en suero de aproximadamente 5 días en suero de ratón (FIG. 3A) y una vida media en tejido de 2 a 5 días (Figura 3B).

FIG. 4 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de una proteína de folistatina-Fc ejemplar sobre el peso muscular del cuadriceps (FIG. 4A), gastrocnemio (FIG. 4B), tibial anterior (FIG. 4C) y tríceps (FIG. 4D) después de 4 y 10 semanas de exposición a 1 mg/kg FS315-mFc y 6 semanas de exposición a 8 mg/kg. Los pesos musculares se corrigen al peso corporal basal.

FIG. 5 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de la proteína de folistatina-Fc ejemplar en los niveles séricos de folistatina a lo largo del tiempo. FIG.5A. muestra los niveles en el suero después del tratamiento con 1 mg/kg FS315-mFc durante 10 semanas, y FIG.5B. muestra los niveles en el suero después del tratamiento con 8 mg/kg FS315-mFc durante 6 semanas.

FIG. 6 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de la proteína de folistatina-Fc ejemplar en el peso muscular del gastrocnemio después de la exposición a FS315-mFc, sActRIIB-mFc, o control de PBS.

FIG. 7 muestra resultados ejemplares que ilustran los efectos de la folistatina de tipo salvaje y las variantes en el peso corporal. El panel A muestra el peso corporal promedio ejemplar de los animales en cada grupo a lo largo del tiempo, y el panel B muestra el peso corporal promedio ejemplar de los animales en cada grupo en la semana 6 después de la inyección.

FIG. 8 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de las variantes de folistatina sobre el peso del

músculo inyectado en la semana 2 posterior a la inyección. El panel A muestra la masa del músculo gastrocnemio inyectado, mientras que el panel B muestra la masa del cuádriceps muscular inyectado.

5 FIG. 9 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de la eliminación del dominio 3 sobre el músculo inyectado y el músculo a distancia del lugar de la inyección dos semanas después de la inyección. El cuádriceps izquierdo era un sitio de inyección, mientras que el cuádriceps derecho es el músculo de control intra-animal contralateral.

10 FIG. 10 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de las variantes de folistatina sobre el peso de músculos específicos en el lugar de la inyección y distal del lugar de la inyección en la semana 4 después de la inyección. El panel A (gastrocnemio) y el panel B (cuádriceps) se inyectan en el músculo. El panel C (tibial anterior), el panel D (tríceps) y el panel E (diafragma) son músculos distales del lugar de la inyección.

15 FIG. 11 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de la eliminación del dominio 3 en el músculo inyectado y el músculo a distancia del lugar de la inyección cuatro semanas después de la inyección. El cuádriceps izquierdo era un sitio de inyección, mientras que el cuádriceps derecho es el músculo de control intra-animal contralateral.

20 FIG. 12 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de las variantes de folistatina sobre el tamaño de la fibra tanto en los músculos inyectados como en los distales en la semana 2 posterior a la inyección en el cuádriceps (A), en el gastrocnemio (B), en el tibial anterior (C), en el tríceps (D) tibial, y diafragma (E)

25 FIG. 13 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de las variantes de folistatina sobre el tamaño de la fibra tanto en los músculos inyectados como en los distales en la semana 4 posterior a la inyección, en el cuádriceps (A), en el gastrocnemio (B), en el tibial anterior (C), en el tríceps (D), y diafragma (E)

30 FIG. 14 muestra resultados ejemplares que ilustran el efecto de las variantes de folistatina sobre el tamaño de la fibra tanto en los músculos inyectados como en los distales en la semana 6 posterior a la inyección, en el cuádriceps (A), en el gastrocnemio (B), en el tibial anterior (C), en el tríceps (D), y diafragma (E)

FIG. 15 muestra resultados ejemplares que demuestran el efecto de una proteína de folistatina-Fc ejemplar en el diámetro de las miofibras en el gastrocnemio de A) ratones C57 y B) ratones mdx después de 4 semanas de exposición.

35 FIG. 16 muestra resultados ejemplares que demuestran el efecto de una proteína de folistatina-Fc ejemplar sobre el peso corporal de ratones C57 tratados después de 2, 4, 6 u 8 semanas de exposición, en comparación con animales de control con vehículo.

40 FIG. 17 muestra resultados ejemplares que demuestran el efecto de una proteína de folistatina-Fc ejemplar sobre el peso del tríceps y el cuádriceps de los animales tratados como un aumento porcentual sobre los animales de control del vehículo, después de 4 y 8 semanas de exposición.

45 FIG. 18 muestra resultados ejemplares que demuestran el efecto de una proteína de folistatina-Fc ejemplar sobre el diámetro de las miofibras en el tríceps y el cuádriceps de los animales tratados como aumento porcentual sobre los animales de control del vehículo después de 4 y 8 semanas de exposición.

50 FIG. 19 muestra niveles ejemplares de proteína de folistatina-Fc en el suero de animales a los que se administró la proteína de fusión mediante inyección subcutánea dos veces por semana después de 1, 3, 4, 6 u 8 semanas de exposición. El panel A) muestra los resultados de los animales sacrificados después de 4 semanas y el panel B muestra los resultados de los animales sometidos a eutanasia después de 8 semanas de exposición.

55 FIG. 20 muestra resultados ejemplares que demuestran el efecto de la proteína de folistatina-Fc en la expresión del ARNm de tres marcadores de fibrosis: actina del músculo liso alfa, repetición de triple hélice de colágeno que contiene 1 proteína (cthrcl) y colágeno I, en el cuádriceps de los animales tratados en comparación. a los animales de control del vehículo después de 6 o 12 semanas de exposición.

60 FIG. 21 muestra ejemplos de secciones teñidas con H&E de cuádriceps y tejido de tríceps de ratones mdx tratados con vehículo o proteína de folistatina-Fc durante seis semanas. También se muestran las tinciones H&E ejemplares de los cuádriceps y tríceps de los ratones de control C57.

FIG. 22 muestra ejemplos de secciones teñidas con colágeno I de cuádriceps, tríceps y tejido diafragma de ratones mdx tratados con vehículo o proteína de folistatina-Fc durante doce semanas. También se muestran las muestras de colágeno I ejemplares de los cuádriceps, tríceps y diafragma de ratones de control C57

65 FIG. 23 muestra resultados ejemplares que demuestran los efectos de las inyecciones intramusculares dos

veces por semana de una de las dos variantes de folistatina, una proteína de fusión FS315-mFc y una proteína de fusión variante dFSD3-mFc, en los pesos musculares de ratones C57BL/10 tratados durante cuatro semanas en comparación con el músculo contralateral controla el músculo.

5 FIG. 24 muestra resultados ejemplares que demuestran que las proteínas de fusión FS315-GAG3-mFc y FS315-GAG3-hFc inhiben (A) la miostatina y (B) la señalización de activina en el ensayo CAGA-luciferasa en el mismo grado que la FS315 nativa. En comparación, Sino Biological FS315-hFc (fabricado por Sino Biological Inc. Número de catálogo 10685-H02H) que contiene un enlazador de 9 aminoácidos es significativamente menos potente.

10 FIG. 25 muestra los niveles de proteína FS315-GAG3-hFc en el suero de ratas a las que se les administró una sola inyección SC de 10 mg/kg de proteína. La vida media sérica calculada fue de 3,5 días.

DEFINICIONES

15 **[0030]** A fin de que la presente invención se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

20 **[0031] Animal:** Como se usa aquí, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a los humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal manipulado genéticamente y/o un clon.

25 **[0032] Aproximadamente o alrededor de:** Como se usa aquí, el término "aproximadamente" o "alrededor de", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

35 **[0033] Biodisponibilidad:** Como se usa aquí, el término "biodisponibilidad" generalmente se refiere al porcentaje de la dosis administrada que alcanza el torrente sanguíneo de un sujeto.

40 **[0034] Biológicamente activo:** Como se usa aquí, la frase "biólogicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y en particular en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando un péptido es biológicamente activo, una porción de ese péptido que comparte al menos una actividad biológica del péptido se denomina típicamente una porción "biólogicamente activa".

45 **[0035] Músculo cardíaco:** Como se usa aquí, el término "músculo cardíaco" se refiere a un tipo de músculo estriado involuntario encontrado en las paredes del corazón, y en particular el miocardio.

50 **[0036] Vehículo o diluyente:** Como se utiliza aquí, los términos "vehículo" y "diluyente" se refiere a un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) o sustancia útil diluyente para la preparación de una formulación farmacéutica. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWHI), una solución tamponada de pH (p. ej., solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

55 **[0037] Folistatina o folistatina recombinante:** Como se usa aquí, el término "folistatina (FS)" o "folistatina recombinante" se refiere a cualquier de tipo salvaje y las proteínas folistatinas modificadas (p. ej., proteínas de folistatina con mutaciones de aminoácidos, deleciones, inserciones, y (o) proteínas de fusión) que retienen una actividad biológica importante de folistatina a menos que se especifique lo contrario. Un ejemplo no limitativo de eliminaciones es una eliminación del dominio 3 (Δ D3 o dFSD3). Un ejemplo no limitante de proteínas de fusión es una proteína de fusión Fc.

60 **[0038] Equivalente funcional o derivado:** Como se usa aquí, el término "equivalente funcional" o "derivado funcional" denota, en el contexto de un derivado funcional de una secuencia de aminoácidos, una molécula que retiene una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a la de la secuencia original. Un derivado funcional o equivalente puede ser un derivado natural o se prepara sintéticamente. Los derivados

65

funcionales ejemplares incluyen secuencias de aminoácidos que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de uno o más aminoácidos, siempre que se conserve la actividad biológica de la proteína. El aminoácido de sustitución deseablemente tiene propiedades físico-químicas que son similares a las del aminoácido sustituido. Las propiedades químicas y físicas similares deseables incluyen similitudes en la carga, volumen, hidrofobicidad, hidrofiliidad y similares.

[0039] Proteína de fusión: Como se usa aquí, el término "proteína de fusión" o "proteína quimérica" se refiere a una proteína creada mediante la unión de dos o más proteínas originalmente separadas, o porciones de las mismas. En algunas realizaciones, un enlazador o espaciador estará presente entre cada proteína.

[0040] Vida media: Como se usa aquí, el término "vida media" es el tiempo requerido para que una cantidad tal como la concentración de proteína o actividad caiga a la mitad de su valor medido al comienzo de un período de tiempo.

[0041] Hipertrofia: Como se usa aquí, el término "hipertrofia" se refiere al aumento en el volumen de un órgano o tejido debido a la ampliación de sus células componentes.

[0042] Mejorar, aumentar o reducir: Como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores relativos a una medición de línea de base, tales como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en este documento, o una medición en un sujeto de control (o sujeto de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito en este documento. Un "sujeto de control" es un sujeto que padece la misma forma de enfermedad que el sujeto que está siendo tratado, que tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que está siendo tratado.

[0043] In Vitro: Como se usa aquí, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, por ejemplo, en un recipiente de tubo de ensayo o reacción, en cultivo de células, etc., en lugar de dentro de un organismo multi-celular.

[0044] In Vivo: Como se usa aquí, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo multicelular, como un animal no humano y humanos. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (en oposición a, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

[0045] Enlazador: como se usa en este documento, el término "enlazador" se refiere a, en una proteína de fusión, una secuencia de aminoácidos diferente a la que aparece en una posición particular en la proteína natural y generalmente está diseñada para ser flexible o para interponer una estructura, tal como una hélice α , entre dos restos de proteínas. Un enlazador también se conoce como un espaciador. Un enlazador o un espaciador típicamente no tiene función biológica por sí solo.

[0046] Polipéptido: El término "polipéptido" como se usa aquí, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la técnica entenderá que el término no se limita a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos entre sí mediante un enlace de péptido. Como saben los expertos en la técnica, los polipéptidos pueden procesarse y/o modificarse. Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se usan de manera intercambiable.

[0047] Prevención: Como se usa aquí, el término "prevenir" o "prevención", cuando se utiliza en conexión con la aparición de una enfermedad, trastorno, y/o afección, se refiere a reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o condición. Vea la definición de "riesgo".

[0048] Proteína: El término "proteína" tal como se utiliza aquí se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si un solo polipéptido es la unidad de funcionamiento discreto y no requiere asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos para formar la unidad de funcionamiento discreto, los términos "polipéptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente. Si la unidad funcional discreta se compone de más de un polipéptido que se asocia físicamente entre sí, el término "proteína" se refiere a los múltiples polipéptidos que están físicamente acoplados y funcionan juntos como la unidad discreta.

[0049] Riesgo: Como se entenderá a partir del contexto, un "riesgo" de una enfermedad, trastorno, y/o condición comprende una probabilidad de que un individuo particular se desarrollará una enfermedad, trastorno, y/o condición (p. ej., distrofia muscular). En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas realizaciones, el riesgo es de 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta el 100%. En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un riesgo relativo a un riesgo asociado con una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia. En algunas realizaciones, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia tienen un riesgo conocido de enfermedad, trastorno, afección y/o evento (p. ej., distrofia muscular). En algunas realizaciones, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia son de individuos

comparables a un individuo en particular. En algunas realizaciones, el riesgo relativo es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

5 **[0050] *Músculo estriado*:** Como se usa aquí, el término "músculo estriado" se refiere a tejido muscular multinucleado con disposición regular de sus unidades contráctiles intracelulares, sarcómeros, lo que lleva a la aparición de estrías utilizando microscopía y bajo control voluntario. Típicamente, el músculo estriado puede ser músculo cardíaco, músculo esquelético y músculos branquiométricos.

10 **[0051] *Músculo liso*:** Como se usa aquí, el término "músculo liso" se refiere a músculo controlado involuntariamente, no estriado, incluyendo el músculo unitario y de multi-unidad.

15 **[0052] *Sujeto*:** Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un humano o cualquier animal no humano (p. ej., ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdos, oveja, caballo o primate). Un humano incluye formas pre y post natales. En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta a un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa aquí de manera intercambiable con "individual" o "paciente". Un sujeto puede padecer o es susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede o no mostrar síntomas de la enfermedad o trastorno.

20 **[0053] *Sustancialmente*:** Como se usa aquí, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir extensión o grado de una propiedad característica o de interés total o casi total. Una persona con experiencia ordinaria en las artes biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si alguna vez, se completan y/o se completan, logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

25 **[0054] *Homología sustancial*:** La frase "homología sustancial" se utiliza aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos que tendrán características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como saben bien los expertos en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o tienen cadenas laterales "polares" o "no polares" La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución "homóloga".

35 **[0055]** Como es bien conocido en esta técnica, secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico pueden ser comparadas utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas de ordenador comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, gappedBLAST, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Programas ejemplares se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son homólogos a lo largo de una extensión relevante de residuos. En algunas realizaciones, el estiramiento relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el estiramiento relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

50 **[0056] *Identidad sustancial*:** La frase "identidad sustancial" se utiliza aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con espacios y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Ejemplos de tales programas se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son idénticos sobre un tramo de residuos relevante. En algunas realizaciones, el estiramiento relevante es una secuencia completa. En

algunas realizaciones, el estiramiento relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

5 **[0057] *Sufrimiento de:*** Un individuo que está "padeciendo" una enfermedad, trastorno, y/o condición ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno, y/o condición.

10 **[0058] *Susceptible a:*** Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o condición puede no exhibir síntomas de la enfermedad, trastorno y/o condición. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, condición o evento (p. ej., DMD) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno, y/o condición; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (3) aumento y/o disminución de la expresión y/o actividad de una proteína asociada con la enfermedad, trastorno o afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno, afección y/o evento (5) que se han sometido, que planean someterse o que requieren un trasplante. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o condición desarrollará la enfermedad, trastorno y/o condición. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o condición no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o condición.

20 **[0059] *Tejidos diana:*** Como se usa aquí, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido que se ve afectado por una enfermedad a tratar, tal como la distrofia muscular de Duchenne (DMD). En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada con la enfermedad, entre los que se incluyen, entre otros, el desgaste muscular, la deformación del esqueleto, la miocardiopatía y la función respiratoria alterada.

25 **[0060] *Cantidad terapéuticamente eficaz:*** Como se usa aquí, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico, significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o condición, a tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Los expertos en la técnica apreciarán que una cantidad terapéuticamente eficaz se administra típicamente a través de un régimen de dosificación que comprende al menos una dosis unitaria.

30 **[0061] *Tratamiento:*** Como se usa aquí, el término "tratar", "tratamiento" o "tratado" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar parcial o completamente, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o afección en particular. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad y/o muestra solo signos tempranos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con la enfermedad.

40 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES**

45 **[0062]** En este documento se describen, entre otras cosas, métodos y composiciones para el tratamiento de la distrofia muscular, incluida la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y/o la distrofia muscular de Becker, basada en la folistatina como una proteína terapéutica. La presente invención proporciona una proteína de folistatina recombinante para uso en un método de tratamiento de DMD, que incluye la administración a un individuo que sufre o es susceptible de DMD de una cantidad eficaz de una proteína de folistatina recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2 fusionada a un dominio Fc a través de un enlazador peptídico que comprende 10 o más aminoácidos y en donde el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7, de manera que al menos un síntoma o característica de la DMD se reduce en intensidad, severidad, o frecuencia, o ha retrasado el inicio.

50 **[0063]** Se describen varios aspectos de la invención en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

55 ***Distrofia muscular de Duchenne (DMD)***

60 **[0064]** La DMD es una enfermedad caracterizada por el deterioro progresivo de los músculos y la pérdida de funciones relacionadas con los músculos en todo el cuerpo. Se contempla que la presente invención proporciona métodos y composiciones para regenerar músculos y tratar la fibrosis, la inflamación y otros síntomas o características asociadas con la DMD y otras distrofias musculares en diversos tejidos musculares. En algunas realizaciones, el uso de los métodos y composiciones proporcionados en un sujeto da como resultado una disminución de la fibrosis y/o necrosis en ese sujeto.

65 ***Tejidos musculares***

[0065] Hay dos tipos principales de tejido muscular en un animal - músculo estriado y el músculo liso. Como se usa en este documento, el término "músculo estriado" se refiere a los tejidos musculares que contienen sarcómeros que se repiten. El músculo estriado tiende a estar bajo control voluntario y está unido al esqueleto, aunque hay algunas excepciones, como el músculo cardíaco, que tiene varias propiedades de músculo estriado, pero no está bajo control voluntario. En general, el músculo estriado permite el movimiento voluntario del cuerpo e incluye los principales grupos musculares, como el cuádriceps, el gastrocnemio, el bíceps, el tríceps, el trapecio, los deltoides y muchos otros. El músculo estriado tiende a ser muy largo y muchos músculos estriados pueden funcionar de manera independiente. Sin embargo, algunos músculos estriados no están unidos al esqueleto, incluidos los de la boca, el ano, el corazón y la parte superior del esófago.

[0066] El músculo liso, por otro lado, tiene una estructura muy diferente. En lugar de una serie de músculos largos con uniones esqueléticas separadas, el músculo liso tiende a organizarse en láminas continuas con enlaces mecánicos entre las células del músculo liso. El músculo liso a menudo se encuentra en las paredes de los órganos huecos y generalmente no está bajo control voluntario. Los músculos lisos que recubren un órgano particular deben soportar la misma carga y contraerse simultáneamente. Las funciones del músculo liso, al menos en parte, para manejar los cambios en la carga en los órganos huecos causados por el movimiento y/o cambios en la postura o la presión. Esta doble función significa que el músculo liso no solo debe poder contraerse como el músculo estriado, sino que también debe poder contraerse tónicamente para mantener las dimensiones de los órganos contra cargas sostenidas. Ejemplos de músculos lisos son los que recubren los vasos sanguíneos, la vejiga, la vía gastrointestinal, como el recto.

[0067] La fuerza de un músculo depende del número y tamaño de las células del músculo y en su disposición anatómica. El aumento del diámetro de una fibra muscular, ya sea por el aumento del tamaño de las miofibrillas existentes (hipertrofia) y/o la formación de más células musculares (hiperplasia) aumentará la capacidad de generación de fuerza del músculo.

[0068] Los músculos también se pueden agrupar por ubicación o función. En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante se dirige a uno o más músculos de la cara, uno o más músculos para la masticación, uno o más músculos de la lengua y el cuello, uno o más músculos del tórax, uno o más músculos de la cintura escapular y brazos, uno o más músculos del brazo y el hombro, uno o más músculos del antebrazo ventral y dorsal, uno o más músculos de la mano, uno o más músculos de la espina erectora, uno o más músculos de la cintura escapular y piernas y/o uno o más músculos de la pata delantera y el pie.

[0069] En algunas realizaciones, los músculos de la cara incluyen, pero no se limitan a, los músculos intraoculares tales como ciliar, el dilatador del iris, esfínter del iris; músculos de la oreja, tales como auriculares, temporoparietal, stapedius, tensor tímpano; músculos de la nariz como prócer, nasal, naris dilatador, depressor septi nasi, Elevador del labio superior alaeque nasi; músculos de la boca como levator anguli oris, depressor anguli oris, orbicularis oris, Buccinador, Zigomático Mayor y Menor, Platisma, Elevador del labio superior, Depressor Labii Inferioris, Risorio, Mentoniano, y/o Corrugador Supercilii.

[0070] En algunas realizaciones, los músculos de la masticación incluyen, pero no se limitan a, Masetero, Temporal, Pterigoideo Medial, Pterigoideo Lateral. En algunas formas de realización, los músculos de la lengua y el cuello incluyen, pero no se limitan a, Geniogloso, Estilogloso, Palatogloso, Hiogloso, Digástrico, Estilohioide, Milohioide, Geniohioide, Omohioide, Esternohioide, Esternotiroideo, Tirohioide, Esternocleidomastoideo, Escaleno anterior, Escaleno medio y/o Escaleno posterior.

[0071] En algunas realizaciones, los músculos del tórax, cintura escapular, y los brazos incluyen, pero no se limitan a, Subclavio pectoral mayor, pectoral menor, recto abdominal, oblicuo abdominal externo, oblicuo abdominal interno, transverso abdominal, diafragma, intercostales externos, intercostales internos, serratos anteriores, trapecio, escápulas elevadoras, romboideo mayor, Romboideo Menor, músculo dorsal, deltoides, subescapular, supraespinoso, infraespinoso, redondo mayor, redondo menor y/o coracobraquial.

[0072] En algunas realizaciones, los músculos del brazo y el hombro incluyen, pero no se limitan a, Bíceps braquial-Cabeza larga, Bíceps braquial-Cabeza corta, Tríceps braquial-Cabeza larga, tríceps braquial-Cabeza lateral, Tríceps braquial-Cabeza medial, Anconeo, Pronador redondo, Supinador y/o Braquial.

[0073] En algunas realizaciones, los músculos del antebrazo ventral y dorsal incluyen, pero no se limitan a, braquiorradial, flexor radial del carpo, flexor cubital del carpo, palmar largo, Extensor cubital del carpo, extensor carpi radial largo, extensor radial brevis, Extensor digitorum, extensor digiti minimi.

[0074] En algunas realizaciones, los músculos de la mano incluyen, pero no se limitan a los músculos intrínsecos de la mano, tales como tenar, abductor pollicis brevis, flexor pollicis brevis, oponente del pulgar, hipotenar, abductor, el flexor del meñique brevis, oponentes digiti minimi, palmar interossei, dorsal interossei y/o lumbricales.

[0075] En algunas realizaciones, los músculos de erector de la columna incluyen, pero no se limitan a, cervicalis,

spinalis, longísimo, y/o iliocostal.

[0076] En algunas realizaciones, los músculos de la cintura pélvica y las piernas incluyen, pero no se limitan a, psoas mayor, ilíaco, cuadrado femoral, aductor largo, aductor corto, aductor mayor, Recto interno, Sartorio, cuádriceps femoral, tales como, rectus femoris, vasto lateral, vasto medial, vasto intermedio, Gastrocnemio, Peróneo largo, Soleo, Glúteo mayor, Gluteus medio, Gluteus minimus, Cuerdas de tendón: Bíceps Femorino: Cabeza larga, isquiotibiales: bíceps femoral, Cabeza corta, isquiotibiales: Semitendinosos, isquiotibiales: Semimembranosos, Tensor de la fascia lata, Pectíneo, y/o tibial anterior.

[0077] En algunas realizaciones, los músculos del miembro anterior y el pie incluyen, pero no se limitan a, extensor largo de los dedos, extensor largo del dedo gordo, peroneo brevis, plantar, tibial posterior, flexor largo del dedo gordo, extensor corto de los dedos, extensor corto del dedo gordo, abductor del dedo gordo, flexor del dedo corto, abductor del meñique, flexor del meñique, oponente del meñique, extensor del dedo corto, lumbricales del pie, cuadrado plantar, flexor del dedo corto, interóseos dorsales y/o interóseos plantares.

[0078] Los dianas musculares ejemplares se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

ORBICULARIS OCULI			
Intraocular: ciliar, dilatador del iris, esfínter del iris			
Oído: auriculares, temporoparietal, estapedio, tensor tímpano			
Nariz: prócer, nasal, dilatador de la nariz, depresor del tabique nasal, elevador del labio superior alaeque nasi			
Boca: elevador del ángulo de la boca, depresor del ángulo de la boca, orbicular de la boca			
Buccinador	Cigomático mayor y menor	Platisma	Elevador del labio superior
Depresor del labio inferior	Risorio	Mentoniano	Corrugador superciliar
Anconeo	Pronador redondo	Supinador	Braquial
MÚSCULOS DE MASTICACIÓN			
Masetero	Temporal	Pterigoideo medial	Pterigoideo Lateral
MÚSCULOS DE LA LENGUA Y EL CUELLO			
Geniogloso	Estilogloso	Palatogloso	Hiogloso
Digástrico	Estilohioide	Milohioide	Geniohioideo
Omohioide	Esternohioide	Esternotiroido	Tirohioideo
Esternocleidomastoides	Escaleno anterior	Escaleno medio	Escaleno posterior
MÚSCULOS DEL TÓRAX, CINTURA ESCAPULAR Y BRAZOS			
Subclavio	Pectoral mayor	Pectoral menor	Recto abdominal
Oblicuo externo abdominal	Oblicuo interno del abdomen	Transverso abdominal	Diafragma
Intercostales externos	Intercostales internos	Serrato anterior	Trapezio
Elevador de la escápula	Romboideo mayor	Romboide menor	Dorsal ancho
Deltoides	subescapular	supraespinoso	infraespinoso
Redondo mayor	Redondo menor	Coracobraquial	
BRAZO Y HOMBRO			
Bíceps braquial-cabeza larga	Bíceps braquial-cabeza corta	Tríceps braquial-cabeza larga	Tríceps braquial-cabeza lateral
Tríceps braquial-cabeza medial	Anconeo	Pronador redondo	Supinador
Braquial			
MÚSCULOS ANTERIORES: ventral y dorsal			
Braquioradialis	Flexor carpi radialis	Flexor carpi ulnaris	Palmaris longus
Extensor cubital del carpo	Extensor carpi radialis largo	Extensor carpi radialis breve	Extensor digitorum
Extensor propio del meñique	espinas erectoras: cervical	erector de la columna vertebral: espinal	erector de espinas: longísimo

(continúa)

	MÚSCULOS ANTERIORES: ventral y dorsal			
5	erector de espinas: iliocostal			
	Músculos intrínsecos de la mano: tenar, abductor del pulgar corto, flexor del pulgar corto, y el oponente del pulgar			
10	Músculos intrínsecos de la mano: hipotenar, abductor del meñique, flexor corto del meñique, y los oponentes del meñique			
	Músculos intrínsecos de la mano: interóseo palmar, interóseo dorsal y lumbricales			
	MÚSCULOS DE LA NIÑA PÉLVICA Y LAS PIERNAS			
15	Iliopsoas: Psoas Mayor	Iliopsoas: Iliacus	cuadrante femoral	Aductor largo
	Aductor corto	Aductor mayor	Grácil	Sartorio
	Cuadríceps femoral: recto femoral	Cuádriceps femoral: vasto lateral.	Cuádriceps femoral: vasto medial	Cuádriceps femoral: vasto intermedio.
	Gastrocnemio	Peroneo largo	Soleo	Glúteo mayor
20	Gluteus medio	Gluteus minimus	Isquiotibiales: biceps femoris: cabeza larga	Isquiotibiales: biceps femoris: cabeza corta
	Isquiotibiales: semitendinosus	Isquiotibiales: semimembranoso	Tensor de la fascia lata	Pectineo
25	Tibial anterior			
	MÚSCULOS DE LA PIERNA ANTERIOR Y EL PIE			
	Extensor largo de los dedos	Extensor largo del dedo gordo	peroneo breve	músculo plantar
30	Tibial posterior	Flexor largo del dedo gordo	extensor del dedo corto	extensor corto del dedo gordo
	Abductor del alucis	Flexor corto del dedo gordo	Abductor del meñique	flexor del meñique
	oponentes del meñique	extensor del dedo corto	lumbricales del pie	Cuadrado plantar o flexor accesorio
35	Flexor del dedo corto	interóseo dorsal	interóseos plantares	

Distrofia muscular

[0079] Las distrofias musculares son un grupo de trastornos hereditarios que causan la degeneración del músculo, lo que conduce a movimientos débiles y alterados. Una característica central de todas las distrofias musculares es que son de naturaleza progresiva. Las distrofias musculares incluyen, pero no se limitan a: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular de la cintura y extremidades, y distrofia miotónica de los tipos 1 y 2, incluida la forma congénita de Distrofia miotónica tipo 1. Los síntomas pueden variar según el tipo de distrofia muscular, afectando algunos o todos los músculos. Los síntomas ejemplares de las distrofias musculares incluyen el desarrollo retardado de las habilidades motoras musculares, dificultad para usar uno o más grupos musculares, dificultad para tragar, hablar o comer, babear, caída del párpado, caída frecuente, pérdida de fuerza en un músculo o grupo de músculos como adulto, pérdida en el tamaño muscular, problemas para caminar debido a la debilidad o alteración de la biomecánica del cuerpo, hipertrofia muscular, pseudohipertrofia muscular, infiltración grasa del músculo, reemplazo del músculo con tejido no contráctil (p. ej., fibrosis muscular), necrosis muscular y/o cognitivo o deterioro del comportamiento/retraso mental.

[0080] Si bien no hay cura conocida para las distrofias musculares, varios tratamientos de apoyo se utilizan terapias que incluyen tanto sintomáticas como modificadoras de la enfermedad. Los corticosteroides, la terapia física, los dispositivos ortopédicos, las sillas de ruedas u otros dispositivos médicos de asistencia para las ADL y la función pulmonar se usan comúnmente en las distrofias musculares. Los marcapasos cardíacos se utilizan para prevenir la muerte súbita por arritmias cardíacas en la distrofia miotónica. Los agentes antimiotónicos que mejoran los síntomas de la miotonía (incapacidad para relajarse) incluyen mexilitina y, en algunos casos, fenitoína, procainamida y quinina.

Distrofia muscular de Duchenne

[0081] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una forma recesiva de distrofia muscular ligada al X que resulta en la degeneración muscular y la muerte eventual. La DMD se caracteriza por la debilidad en los músculos

proximales, la marcha anormal, la psiohipertrofia en los músculos gastrocnemios (pantorrillas) y la quinasa de creatina (CK) elevada. Muchos pacientes con DMD se diagnostican alrededor de los 5 años, cuando los síntomas/signos suelen ser más evidentes. Las personas afectadas generalmente dejan de caminar alrededor de los 10 a 13 años de edad y mueren antes o después de los 20 años de edad debido a una disfunción cardiorrespiratoria.

[0082] El trastorno DMD es causado por una mutación en el gen de la distrofina, que se encuentra en el cromosoma X humano, que codifica para la proteína distrofina, un componente estructural importante dentro del tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al distroglicano complejo (DGC) de la membrana celular. La distrofina une la red de filamentos de actina citoplásmica interna y la matriz extracelular, proporcionando fuerza física a las fibras musculares. En consecuencia, la alteración o ausencia de distrofina da como resultado un desgarramiento anormal de la membrana sarcolémica y necrosis de las fibras musculares. Si bien las personas de ambos sexos pueden portar la mutación, las mujeres rara vez presentan signos graves de la enfermedad.

[0083] Un síntoma principal de la DMD es la debilidad muscular asociada con atrofia muscular con los músculos voluntarios siendo afectados primero típicamente, afectando especialmente a los músculos de las caderas, área pélvica, muslos, hombros y músculos de la pantorrilla. La debilidad muscular también se produce en los brazos, el cuello y otras áreas. Las pantorrillas son a menudo agrandadas. Los signos y síntomas generalmente aparecen antes de los 6 años y pueden aparecer tan temprano como en la infancia. Otros síntomas físicos incluyen, entre otros, retraso en la capacidad para caminar de forma independiente, dificultad progresiva para caminar, pasos o correr y la pérdida final de la capacidad para caminar (generalmente a los 15 años); caídas frecuentes; fatiga; dificultad con las habilidades motoras (correr, brincar, saltar); aumento de la lordosis lumbar, que lleva a acortar los músculos flexores de la cadera; las contracturas del tendón de Aquiles y los isquiotibiales afectan la funcionalidad debido a que las fibras musculares se acortan y se produce fibrosis en el tejido conectivo; deformidades de la fibra muscular; pseudohipertrofia (agrandamiento) de los músculos de la lengua y la pantorrilla causados por el reemplazo del tejido muscular por la grasa y el tejido conectivo; mayor riesgo de trastornos neuroconductuales (p. ej., TDAH), trastornos del aprendizaje (dislexia) y debilidades no progresivas en habilidades cognitivas específicas (en particular memoria verbal a corto plazo); deformidades esqueléticas (incluyendo escoliosis en algunos casos).

Proteínas de folistatina recombinantes

[0084] Como se describe en el presente documento, las proteínas recombinantes incluyen folistatina de tipo salvaje y las proteínas folistatinas modificadas (p. ej., proteínas de folistatina con mutaciones de aminoácidos, deleciones, inserciones, y/o proteínas de fusión) que retienen la actividad biológica de folistatina sustancial. Típicamente, una proteína de folistatina recombinante se produce usando tecnología recombinante. Sin embargo, las proteínas de lista (de tipo salvaje o modificadas) purificadas a partir de recursos naturales o sintetizadas químicamente pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Típicamente, una proteína de folistatina recombinante adecuada tiene una vida media *in vivo* o mayor que aproximadamente 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 2,5 días, 3 días, 3,5 días, 4 días, 4,5 días, 5 días, 5,5 días, 6 días, 6,5 días, 7 días, 7,5 días, 8 días, 8,5 días, 9 días, 9,5 días o 10 días. En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante tiene una vida media *in vivo* de entre 0,5 y 10 días, entre 1 día y 10 días, entre 1 día y 9 días, entre 1 día y 8 días, entre 1 día y 7 días, entre 1 día y 6 días, entre 1 día y 5 días, entre 1 día y 4 días, entre 1 día y 3 días, entre 2 días y 10 días, entre 2 días y 9 días, entre 2 días y 8 días, entre 2 días y 7 días, entre 2 días y 6 días, entre 2 días y 5 días, entre 2 días y 4 días, entre 2 días y 3 días, entre 2,5 días y 10 días, entre 2,5 días y 9 días, entre 2,5 días y 8 días, entre 2,5 días y 7 días, entre 2,5 días y 6 días, entre 2,5 días y 5 días, entre 2,5 días y 4 días, entre 3 días y 10 días, entre 3 días y 9 días, entre 3 días y 8 días, entre 3 días y 7 días, entre 3 días y 6 días, entre 3 días y 5 días, entre 3 días y 4 días, entre 3,5 días y 10 días, entre 3,5 días y 9 días, entre 3,5 días y 8 días, entre 3,5 días y 7 días, entre 3,5 días y 6 días, entre 3,5 días y 5 días, entre 3,5 días y 4 días, entre 4 días y 10 días, entre 4 días y 9 días, entre 4 días y 8 días, entre 4 días y 7 días, entre 4 días y 6 días, entre 4 días y 5 días, entre 4,5 días y 10 días, entre 4,5 días y 9 días, entre 4,5 días y 8 días, entre 4,5 días y 7 días, entre 4,5 días y 6 días, entre 4,5 días y 5 días, entre 4,5 días y 4 días, entre 5 días y 10 días, entre 5 días y 9 días, entre 5 días y 8 días, entre 5 días y 7 días, entre 5 días y 6 días, entre 5,5 días y 10 días, entre 5,5 días y 9 días, entre 5,5 días y 8 días, entre 5,5 días y 7 días, entre 5,5 días y 6 días, entre 6 días y 10 días, entre 7 días y 10 días, entre 8 días y 10 días, entre 9 días y 10 días.

[0085] La folistatina (FS) se aisló por primera vez a partir del líquido folicular, como un factor proteico capaz de suprimir la secreción de la hormona estimulante del folículo hipofisario (FSH). FS ejerce su influencia sobre FSH al menos en parte a través de la unión y neutralización de la activina.

[0086] Hay por lo menos dos isoformas de FS: FS288 y FS315, creadas a través de corte y empalme alternativo en el extremo C-terminal. La isoforma de 288 aminoácidos tiene una estructura distintiva que comprende una región N-terminal de 63 aminoácidos que contiene residuos hidrófobos importantes para la unión de activina, con la mayor parte de la proteína (residuos 64-288) que comprende tres dominios FS 10-cisteína de aproximadamente 73-75 aminoácidos cada uno. Estos dominios 10-cisteína, desde el extremo N hasta el extremo C, se denominan dominio 1, dominio 2 y dominio 3, respectivamente. La isoforma FS315 se crea a través de una extensión ácida del término C codificada por un exón adicional. FS288 tiende a estar unido a tejido debido a la presencia de un dominio de unión a heparina, mientras que FS315 tiende a ser una forma circulante, posiblemente porque el dominio C enmascarado

enmascara el dominio de unión a heparina.

[0087] Se ha demostrado que FS inhibe tanto la miostatina como la activina *in vitro* y que esta inhibición puede conducir a la hipertrofia *in vivo* en ratones (Lee et al., Regulation of Muscle Mass by Follistatin and Activins, (2010), MOL. ENDOCRINOL., 24 (10): 1998-2008; Gilson et al., Follistatin Induces Muscle Hypertrophy Through Satellite Cell Proliferation and Inhibition of Both Myostatin and Activin, (2009), J. PHYSIOL. ENDOCRINOL., 297 (1): E157-E164). Si no queremos que se aplique una teoría particular, este efecto observado puede deberse, al menos parcialmente, a que el FS evita la activación de la vía de Smad2/3 por la miostatina y la activina. Se ha demostrado que la activación de la vía Smad2/3 produce una regulación negativa del crecimiento muscular (Zhu et al., Follistatin Improves Skeletal Muscle Healing After Injury and Disease Through an Interaction with Muscle Regeneration, Angiogenesis, and Fibrosis, (2011), MUSCULOSKELETAL PATHOLOGY, 179 (2): 915-930).

[0088] Las secuencias de aminoácidos de una proteína humana FS315 y FS288 de tipo salvaje típica o de origen natural se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Isoformas ejemplares de follistatina humana

FS315	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNG GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGK TYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCFGSSTCVVDQTNNAVCVT CNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSC EDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKE AACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW (SEQ ID NO: 1)
FS288	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNG GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGK TYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCFGSSTCVVDQTNNAVCVT CNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSC EDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKE AACSSGVLLLEVKHSGSCN (SEQ ID NO: 12)

[0089] Una proteína de follistatina recombinante adecuada para la presente invención es FS315 humano (SEQ ID NO: 1). Como se describe en el presente documento, la SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos canónica para la proteína de la follistatina humana. Además, se considera que una proteína de la follistatina puede ser una isoforma de empalme, como la FS 288 (SEQ ID NO: 12). Alternativamente, se contempla que una proteína de follistatina recombinante puede ser un homólogo o un análogo de una proteína natural o de tipo natural. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína de follistatina de tipo natural o natural puede contener una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos o dominios en comparación con una proteína de follistatina de tipo natural o natural por ejemplo, SEQ ID NO: 1), al tiempo que conserva una actividad sustancial de la proteína de follistatina. Una proteína de follistatina recombinante puede ser sustancialmente homóloga a la proteína de follistatina FS315 humana (SEQ ID NO: 1). En este documento se describe una proteína de follistatina recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo a la SEQ ID NO: 1. También se describe en el presente documento una proteína de follistatina recombinante sustancialmente idéntica a la proteína de la follistatina FS315 humana (SEQ ID NO: 1). Además, en el presente documento se describe una proteína de follistatina recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la SEQ ID NO: 1.

[0090] Los homólogos o análogos de las proteínas de la follistatina humana pueden prepararse de acuerdo con métodos para alterar la secuencia de polipéptidos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los que se encuentran en las referencias que recopilan dichos métodos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos que tendrán características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como saben bien los expertos en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución "homóloga". En algunas realizaciones, las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D. En algunas realizaciones, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a una sustitución de

aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos.

5 **[0091]** Como es bien conocido en esta técnica, secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico se pueden comparar usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, gappedBLAST, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Ejemplares de programas tales como Alschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al.,
10 Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado. de homología.

15 **[0092]** Una proteína de folistatina recombinante puede contener una o más deleciones, inserciones o sustituciones, en comparación con una proteína de folistatina humana de tipo salvaje. Por ejemplo, una proteína de folistatina recombinante puede contener sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a Y185 y/o L191, de la SEQ ID NO: 1.

20 *Variantes de eliminación de dominio*

[0093] Una proteína de folistatina recombinante puede contener una o más deleciones, inserciones o dominio de reemplazo (p. ej., intercambio de dominios) en comparación con una proteína de folistatina humana de tipo salvaje. Por ejemplo, una proteína de folistatina recombinante puede contener una eliminación, inserción y/o reemplazo de secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio 1, 2 y/o 3. Una proteína de folistatina recombinante de la invención puede comprender una eliminación de los residuos de aminoácidos 212-288 de la SEQ ID NO: 1 (que corresponde al dominio 3), como se muestra a continuación:

30 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNEC
ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASS
35 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCISISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI
LEW (SEQ ID NO:2).

40 **[0094]** Se contempla que una proteína de folistatina recombinante puede ser un homólogo o un análogo de un variante de deleción de dominio adecuado, que contiene una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones en comparación con la variante de deleción de dominio folistatina adecuado (p. ej., SEQ ID NO: 2), al tiempo que conserva una actividad sustancial de la proteína de folistatina. Por lo tanto, se describe en este documento una proteína de folistatina recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo o
45 idéntico a la SEQ ID NO: 2.

Proteínas de fusión de folistatina

50 **[0095]** Una proteína de folistatina recombinante puede ser una proteína de fusión entre un dominio de folistatina y otro dominio o resto que típicamente puede facilitar un efecto terapéutico de folistatina, por ejemplo, potenciar o aumentar la estabilidad, potencia y/o administración de proteína de folistatina, o reducir o eliminar la inmunogenicidad, el aclaramiento o la toxicidad. Dichos dominios o restos para una proteína de fusión de folistatina incluyen, pero no se limitan a, dominio Fc, dominio XTEN.

55 Dominio fc

[0096] La proteína de folistatina recombinante de la invención contiene un dominio Fc o una porción del mismo que se une al receptor FcRn. Como ejemplo no limitativo, un dominio Fc adecuado puede derivarse de una subclase de inmunoglobulina como la IgG. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado se deriva de IgG1, IgG2, IgG3 o
60 IgG4. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado se deriva de IgM, IgA, IgD o IgE. Los dominios Fc particularmente adecuados incluyen aquellos derivados de anticuerpos humanos o humanizados. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado es una porción Fc modificada, tal como una porción Fc humana modificada.

[0097] En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una secuencia de aminoácidos mostrada a continuación

5 EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 10 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:3), oí

15 KTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 20 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 25 4); oí

30 DKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 35 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 14).

[0098] En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga o idéntica a la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 14.

[0099] Si se contempla que la unión mejorada entre el dominio Fc y el receptor FcRn da como resultado una vida media en suero prolongada. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones de aminoácidos que conducen a una unión mejorada a FcRn. Varias mutaciones dentro del dominio Fc que efectúan una unión mejorada a FcRn son conocidas en la técnica y pueden adaptarse para poner en práctica la presente invención. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 y/o Asn 434 de IgG1 humano.

[0100] Por ejemplo, un dominio Fc adecuado puede contener mutaciones de H433K (His433Lys) y/o N434F (Asn434Phe). Como ejemplo no limitativo, un dominio Fc adecuado puede contener mutaciones H433K (His433Lys) y N434F (Asn434Phe). A continuación se muestra una secuencia de dominio Fc ejemplar que incorpora las mutaciones:

55 DKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 60 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:15).

65

[0101] Las sustituciones de aminoácidos adicionales que se pueden incluir en un dominio Fc incluyen las descritas en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.277.375.; 8.012.476; y 8.163.881.

Enlazador o espaciador

5 **[0102]** Un dominio de folistatina puede estar directa o indirectamente vinculado a un dominio Fc. La proteína de folistatina recombinante de la invención contiene un enlazador o espaciador que se une a un dominio de folistatina y un dominio Fc. Un enlazador de aminoácidos o espaciador generalmente está diseñado para ser flexible o para interponer una estructura, como una hélice alfa, entre los dos restos de proteínas. Un enlazador o espaciador puede ser relativamente corto, o puede ser más largo. El enlazador o espaciador de la invención es igual o mayor que 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 aminoácidos de longitud. Típicamente, un enlazador más largo puede disminuir el impedimento estérico. En algunas realizaciones, un enlazador comprenderá una mezcla de glicina y residuos de serina. En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender adicionalmente residuos de treonina, prolina y/o alanina. Así, en algunas realizaciones, el enlazador comprende entre 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 10-15 amino ácidos. En algunas realizaciones, el enlazador comprende al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 aminoácidos. El enlazador no es un enlazador que consiste en ALEVLFGQP.

20 **[0103]** Los enlazadores o espaciadores adecuados para la presente invención comprenden la secuencia de aminoácidos de: GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (enlazador GAG, SEQ ID NO: 5); GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (enlazador GAG2, SEQ ID NO: 6); o

25 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGG
GAP (enlazador GAG3, SEQ ID NO:7).

30 **[0104]** Enlazadores o espaciadores adecuados también incluyen los que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a los ejemplos de adaptadores anteriormente, por ejemplo, enlazador GAG (SEQ ID NO: 5), enlazador GAG2 (SEQ ID NO: 6), o enlazador GAG3 (SEQ ID NO: 7). Enlazadores adicionales pueden ser encontrados en US20120232021, presentada el 2 de marzo de 2012.

35 **[0105]** En algunas realizaciones, se proporciona un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc sin afectar sustancialmente a la capacidad del polipéptido de folistatina para unirse a cualquiera de sus ligandos afines (p. ej., activina, miostatina, heparina, etc.). En algunas realizaciones, se proporciona un enlazador tal que la unión de un péptido de folistatina a heparina no se altera en comparación con el polipéptido de folistatina solo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido de folistatina es un polipéptido FS315, que normalmente no se une a heparina a menos que esté asociado con activina. En algunas de tales realizaciones, se proporciona un enlazador que no da como resultado un aumento de la unión a heparina del polipéptido FS315 en comparación con el polipéptido FS315 solo.

Proteínas de fusión de folistatina ejemplares

45 **[0106]** La proteína de fusión folistatina recombinante incluye un polipéptido de folistatina, un dominio Fc, y un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc, en el que el polipéptido de folistatina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la proteína FS315 humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) o una proteína FS315 eliminada del dominio 3 (SEQ ID NO: 2), en donde el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7, y en donde la proteína de fusión de folistatina recombinante es capaz de se une a la activina y la miostatina y tiene una vida media *in vivo* que varía de aproximadamente 0,5-10 días. En algunas realizaciones, la proteína de fusión folistatina recombinante tiene una en la semivida *in vivo* que varía de aproximadamente 0,5-6 días (p. ej., aproximadamente 0,5-5,5 días, aproximadamente 0,5-5 días, aproximadamente 1-5 días, aproximadamente 1,5-5 días, aproximadamente 1,5-4,5 días, aproximadamente 1,5-4,0 días, aproximadamente 1,5-3,5 días, aproximadamente 1,5-3 días, aproximadamente 1,5-2,5 días, aproximadamente 2-6 días, aproximadamente 2-5,5 días, aproximadamente 2-5 días, aproximadamente 2-4,5 días, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 2-3,5 días, aproximadamente 2-3 días). En algunas realizaciones, una proteína de fusión de folistatina recombinante adecuada tiene una vida media *in vivo* que varía de aproximadamente 2-10 días (p. ej., que varía de aproximadamente 2,5-10 días, de aproximadamente 3-10 días, de aproximadamente 3,5-10 días, de aproximadamente 4-10 días, desde aproximadamente 4,5-10 días, desde aproximadamente 5-10 días, desde aproximadamente 3-8 días, desde aproximadamente 3,5-8 días, desde aproximadamente 4-8 días, desde aproximadamente 4,5-8 días, desde aproximadamente 5-8 días, de aproximadamente 3-6 días, de aproximadamente 3,5-6 días, de aproximadamente 4-6 días, de aproximadamente 4,5-6 días, de aproximadamente 5-6 días).

65 **[0107]** Como ejemplos no limitativos, las proteínas de fusión Fc de folistatina adecuadas pueden tener una

ES 2 715 710 T3

secuencia de aminoácidos que se muestra a continuación:

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGK~~K~~CRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASS
10 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
VGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
15 EDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
20 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
25 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8),

o

30 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGK~~K~~CRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASS
35 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
VGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
EDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
40 GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
45 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9).

50 **[0108]** Como otros ejemplos no limitantes, proteínas de fusión Fc folistatina adecuadas pueden tener una secuencia de aminoácidos se muestra a continuación:

55

60

65

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAAYCVTCNRICPEPASS
10 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCISISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSE
LEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
GGGGAPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
15 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

20 QPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO:10),

o

25 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
30 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAAYCVTCNRICPEPASS
EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCISISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSE
LEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
35 GGGGAPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
40 QPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO:11).

45 **[0109]** Como todavía otros ejemplos no limitantes, proteínas de fusión Fc folistatina adecuadas pueden tener una
secuencia de aminoácidos mostrada a continuación:

50

55

60

65

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
 NCIPCKETCENVDCGPGKKRCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
 10 VGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
 EDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
 GGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 15 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 20 HEALTHHNYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

O

25 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAP
 NCIPCKETCENVDCGPGKKRCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNEC
 30 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
 35 VGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSIS
 EDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
 40 GGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 45 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALKFHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

50 **[0110]** En el presente documento se describe una proteína de fusión Fc de folistatina recombinante adecuada que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga o idéntica a SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 16 o 17.

55 **[0111]** Si se contempla que una proteína de fusión folistatina-Fc puede proporcionarse en diversas configuraciones que incluyen configuraciones modoméricas o monoméricas. Por ejemplo, una configuración homodimérica adecuada puede diseñarse para tener el extremo C-terminal de la pareja de fusión (p. ej., un polipéptido de folistatina más un enlazador) unido al extremo N-terminal de ambas cadenas de polipéptidos Fc. Una configuración monomérica adecuada puede diseñarse para tener el extremo C-terminal de la pareja de fusión (p. ej., un polipéptido de folistatina más un conector) fusionado a un dímero Fc. Una configuración monomérica puede disminuir el impedimento estérico.

60 **[0112]** Como se usa en este documento, "porcentaje (%)de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de proteína de referencia (p. ej., una secuencia de proteína de folistatina de referencia) identificada en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e

introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando un software informático disponible públicamente como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Preferiblemente, el software WU-BLAST-2 se usa para determinar la identidad de la secuencia de aminoácidos (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales están configurados en los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: intervalo de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral mundial (T) = 11. Los parámetros HSP score(s) y HSP S2 son valores dinámicos y están establecidos por el propio programa, dependiendo de la composición de la secuencia en particular, sin embargo, los valores mínimos pueden ajustarse y configurarse como se indicó anteriormente.

Producción de proteínas de folistatina recombinantes

[0113] Una proteína de folistatina recombinante adecuada para la presente invención se puede producir por cualquier medio disponible. Por ejemplo, una proteína de folistatina recombinante puede producirse de forma recombinante utilizando un sistema de células huésped diseñado para expresar un ácido nucleico que codifica la proteína de folistatina recombinante. Alternativa o adicionalmente, se puede producir una proteína de folistatina recombinante activando genes endógenos. Alternativa o adicionalmente, una proteína de folistatina recombinante puede prepararse parcial o totalmente mediante síntesis química.

[0114] En el caso de que las proteínas se produzcan de forma recombinante, se puede usar cualquier sistema de expresión. Para dar sólo unos pocos ejemplos, sistemas de expresión conocidos incluyen, por ejemplo, *E. Coli*, huevo, baculovirus, plantas, levadura o células de mamíferos.

[0115] En algunas realizaciones, las proteínas de folistatina recombinantes adecuadas para la presente invención se producen en células de mamífero. Los ejemplos no limitativos de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36: 59,1977); línea celular de fibrosarcoma humano (p. ej., HT1080); células de riñón de hámster bebé (BHK₂1, ATCC CCL 10); Células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77: 4216, 1980); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); Células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals NY Acad. Sci.*, 383: 44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0116] En algunas realizaciones, las proteínas de folistatina recombinantes se producen a partir de células humanas. En algunas realizaciones, las proteínas de folistatina recombinantes se producen a partir de células CHO o células HT1080.

[0117] Típicamente, las células que están diseñadas para expresar una proteína de folistatina recombinante pueden comprender un transgén que codifica una proteína de folistatina recombinante descrita en este documento. Debe apreciarse que los ácidos nucleicos que codifican la proteína de la folistatina recombinante pueden contener secuencias reguladoras, secuencias de control de genes, promotores, secuencias no codificantes y/u otras secuencias apropiadas para expresar la proteína de la folistatina recombinante. Típicamente, la región codificante está unida operativamente con uno o más de estos componentes de ácido nucleico.

[0118] La región de codificación de un transgén puede incluir una o más silenciosas mutaciones para optimizar el uso de codones para un tipo celular particular. Por ejemplo, los codones de un transgén de folistatina pueden optimizarse para la expresión en una célula de vertebrados. En algunas realizaciones, los codones de un transgén de folistatina pueden optimizarse para la expresión en una célula de mamífero. En algunas realizaciones, los codones de un transgén de folistatina pueden optimizarse para la expresión en una célula humana.

Composición farmacéutica y administración.

[0119] La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que contiene una proteína de fusión folistatina recombinante de la presente invención y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

5 **[0120]** Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas (p. ej., NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma árabe, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa, u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas pueden, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares (p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares) que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos ni interfieren con su actividad. En una realización preferida, se usa un portador soluble en agua adecuado para administración intravenosa.

15 **[0121]** Una composición farmacéutica adecuada o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Una composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, tableta, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. Una composición también se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales, como los triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

20 **[0122]** Una composición farmacéutica o medicamento se pueden formular de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición para administración intravenosa típicamente es una solución en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o sachette que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua, solución salina o dextrosa/agua estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

35 **[0123]** Una proteína de folistatina recombinante descrita en la presente memoria se puede formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libres, tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico. hidróxidos, isopropilamina, trietilamina, 2 etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Vías de administración

40 **[0124]** Una proteína de folistatina recombinante descrita en la presente memoria (o una composición o medicamento que contiene una proteína de folistatina recombinante descrita en el presente documento) se administra por cualquier vía apropiada. En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante o una composición farmacéutica que la contiene se administra sistémicamente. La administración sistémica puede ser intravenosa, intradérmica, inhalatoria, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea, intramuscular, oral y/o transmucosa. En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante o una composición farmacéutica que la contiene se administra por vía subcutánea. Como se usa en este documento, el término "tejido subcutáneo" se define como una capa de tejido conectivo suelto e irregular inmediatamente debajo de la piel. Por ejemplo, la administración subcutánea se puede realizar inyectando una composición en áreas que incluyen, entre otras, la región del muslo, la región abdominal, la región glútea o la región escapular. En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante o una composición farmacéutica que la contiene se administra por vía intravenosa. En algunas formas de realización, una proteína de folistatina recombinante o una composición farmacéutica que la contiene se administra por vía oral. Se puede usar más de una ruta simultáneamente, si se desea.

55 **[0125]** En algunas realizaciones, la administración resulta sólo en un efecto localizado en un individuo, mientras que en otras realizaciones, la administración resulta en efectos a lo largo de múltiples partes de un individuo, por ejemplo, efectos sistémicos. Típicamente, la administración da como resultado el suministro de una proteína de folistatina recombinante a uno o más tejidos diana. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra a uno o más tejidos diana que incluyen, entre otros, el corazón, cerebro, médula espinal, músculo estriado (p. ej., músculo esquelético), músculo liso, riñón, hígado, pulmón y/o bazo. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra al corazón. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra al músculo estriado, en particular, el músculo esquelético. En algunas realizaciones, la proteína de folistatina recombinante se administra al tríceps, tibial anterior, sóleo, gastrocnemio, bíceps, trapecio, deltoides, cuádriceps y/o diafragma.

65 *Formas de dosificación y régimen de dosificación*

[0126] En algunas realizaciones, una composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o de acuerdo con un régimen de dosificación que se correlaciona con un resultado deseado particular (p. ej., con el tratamiento o la reducción de riesgo de una distrofia muscular, como la distrofia muscular de Duchenne).

5 [0127] Las dosis en particular o cantidades a administrar de acuerdo con la presente invención puede variar, por ejemplo, dependiendo de la naturaleza y/o la extensión del resultado deseado, en los detalles de la ruta y/o momento de la administración, y/o en una o más características (p. ej., peso, edad, antecedentes personales, características genéticas, parámetros de estilo de vida, gravedad del defecto cardíaco y/o nivel de riesgo de defecto cardíaco, etc., o combinaciones de los mismos). Dichas dosis o cantidades pueden ser determinadas por los
10 expertos en la materia. En algunas realizaciones, una dosis o cantidad apropiada se determina de acuerdo con técnicas clínicas estándar. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, se determina una dosis o cantidad apropiada a través del uso de uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosis o cantidades deseables u óptimas a administrar.

15 [0128] En diversas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (p. ej., tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o afección subyacente). En algunas realizaciones particulares, las dosis o cantidades apropiadas para administrar pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o *in vitro*.

20 [0129] En algunas realizaciones, una composición proporcionada se proporciona como una formulación farmacéutica. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica es o comprende una dosis unitaria para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación correlacionado con el logro de la reducción de la incidencia o el riesgo de una distrofia muscular, como la distrofia muscular de Duchenne.

25 [0130] En algunas realizaciones, una formulación que comprende una proteína de folistatina recombinante descrita en este documento se administra como una dosis única. En algunas realizaciones, una formulación que comprende una proteína de folistatina recombinante descrita en este documento se administra a intervalos regulares. La administración en un "intervalo", como se usa en este documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se
30 administra periódicamente (a diferencia de una dosis única). El intervalo puede ser determinado por técnicas clínicas estándar. En algunas realizaciones, una formulación que comprende una proteína de folistatina recombinante descrita en el presente documento se administra dos veces al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas, semanalmente, dos veces a la semana, tres veces a la semana, diariamente, dos veces al día o cada seis horas. El intervalo de administración para un solo individuo no necesita ser un intervalo fijo, sino que puede variar
35 con el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo.

[0131] Tal como se utiliza aquí, el término "bimensual" significa la administración una vez cada dos meses (es decir, una vez cada dos meses); el término "mensual" significa administración una vez al mes; el término "cada semana" significa administración una vez cada tres semanas (es decir, una vez cada tres semanas); el término "quincenal" significa administración una vez cada dos semanas (es decir, una vez cada dos semanas); el término "semanal" significa administración una vez por semana; y el término "diario" significa administración una vez por día.

40 [0132] En algunas realizaciones, una formulación que comprende una proteína de folistatina recombinante descrita en el presente documento se administra a intervalos regulares de forma indefinida. En algunas realizaciones, una formulación que comprende una proteína de folistatina recombinante descrita en el presente documento se administra a intervalos regulares durante un período definido.

Terapia de combinación

50 [0133] En algunas realizaciones, una proteína de folistatina recombinante se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos conocidos (p. ej., corticosteroides) actualmente usados para el tratamiento de una distrofia muscular. En algunas realizaciones, el (los) agente(s) terapéutico(s) conocido(s) se administran de acuerdo con su régimen y/o régimen de dosificación estándar o aprobado. En algunas realizaciones, el (los) agente(s) terapéutico(s) conocido(s) se administra(n) de acuerdo con un régimen que se altera en comparación con su régimen de
55 dosificación estándar o aprobado. En algunas realizaciones, tal régimen alterado difiere del régimen de dosificación estándar o aprobado en que una o más dosis unitarias se altera (p. ej., se reduce o aumenta) en cantidad, y/o en que la dosificación se altera en la frecuencia (p. ej., en que uno o más intervalos entre dosis unitarias se expanden, resultando en una frecuencia más baja, o se reducen, resultando en una frecuencia más alta).

EJEMPLOS

Ejemplo 1. La folistatina se dirige específicamente a la miostatina y la activina.

65 [0134] Este ejemplo ilustra la unión de la folistatina a los ligandos diana y no diana para evaluar la seguridad de la folistatina como una proteína terapéutica para tratar la DMD. Sin desear estar ligado a la teoría, se contempla que la

activación de la vía de Smad2/3 por miostatina y activina conduce a la inhibición de la expresión de proteínas miogénicas. Como resultado, los mioblastos no pueden diferenciarse en músculo. Por lo tanto, la miostatina y la activina se consideran objetivos viables para la regeneración muscular. Sin embargo, muchos antagonistas de miostatina y activina, como el receptor de activina soluble tipo IIB (sActRIIB), también se unen a proteínas morfogénicas óseas (BMP) debido a ciertas similitudes estructurales. Las BMP, especialmente BMP-9 y BMP-10, se consideran señales morfogénicas pivotales, que orquestan la arquitectura tisular en todo el cuerpo. La inhibición de tales BMP puede conducir a condiciones patológicas no deseadas. Como se describe en detalle a continuación, los datos experimentales descritos en este ejemplo confirman que la folistatina se dirige específicamente a la miostatina y la activina con alta afinidad y no se une a BMP no diana con una afinidad significativa. Por lo tanto, este ejemplo demuestra que la folistatina puede ser una proteína terapéutica segura con menos efectos no deseados fuera del objetivo en comparación con otros moduladores de la miostatina, como sActRIIB.

[0135] Específicamente, se utilizaron las folistatinas disponibles comercialmente (FS315, fabricadas por R&D Systems y la quimera humana de folistatina-Fc FS315-hFc, fabricada por Sino Biological), y las proteínas de fusión FS315-GAG3-mFc para evaluar la afinidad de unión y la cinética de la activina miostatina y BMP que utilizan los ensayos Biacore. Brevemente, FS315 se inmovilizó en un chip CM5, y las proteínas de fusión folistatina-Fc se capturaron utilizando kits de captura de anticuerpos humanos o de ratón (GE Healthcare). Se añadió un analito soluble a 25°C después del acoplamiento de aminos, una serie de concentraciones de activina, miostatina o BMP (p. ej., BMP-2, -4, -6, -7, -9, -10 y GDF-11). sActRIIB-hFc se utilizó como control. Las afinidades de unión (Kd) y la cinética se determinaron utilizando métodos estándar. Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de afinidad de unión y cinética ejemplar

Ligando	Valores KD (M)			
	FS315	FS315-hFc	FS315-mFc	sActRIIB-hFc
BMP-2	4.4E-07	sin unión	sin unión	sin unión
BMP-4	1.4E-08	Nuevo Méjico	8.1E-08	1.3E-07
BMP-6	3.6E-10	9.0E-10	NM	5.7E-11
BMP-7	3.8E-08	Nuevo Méjico	NM	1.1E-09
BMP-9	sin unión	sin unión	sin unión	5.4E-11
BMP-10	1.0E-07	1.5E-07	sin unión	1.0E-11
GDF-11	N/A	8.2E-10	1.8E-14	3.4E-10
miostatina	1.0E-13	8.4E-14	7.3E-14	1.3E-12
activina	7.3E-10	1.9E-10	3.8E-14	7.0E-11

NM = no medible debido a un mal ajuste de la curva o una alta unión al chip de referencia

[0136] Como se muestra en la Tabla 3, la folistatina (p. ej., FS315 o FS315-Fc) se une miostatina diana y la activina con alta afinidad pero no se une BMP-9 y -10 (Kd no medible o mayor que 10^{-7} M), mientras que sActRIIB-Fc se une a miostatina, activina y BMP con afinidad similar. Sorprendentemente y de manera importante, la fusión Fc aumenta la afinidad de la folistatina a la miostatina diana primaria por lo menos 10 veces.

[0137] Además, se utilizaron ensayos de indicador de luciferasa para determinar con más detalle si la folistatina inhibe específicamente la señalización de miostatina y activina (vía Smad 2/3) pero no la señalización BMP (vía Smad 1/5/8). Específicamente, se utilizó un ensayo de Elemento de Respuesta BMP (BRE)-luciferasa para determinar si la folistatina puede inhibir la vía de Smad 1/5/8 mediante la medición de la reducción de la señal de luciferasa (Korchynskyi et al., Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-specific Response Elements in the Id1 Promoter (2002), J BIOL CHEM., 277 (7): 4883-4891). Se utilizó un ensayo CAGA-luciferasa para determinar si la folistatina puede inhibir la vía de Smad 2/3 midiendo la reducción de la señal de luciferasa (Dennler et al., Unión directa de Smad3 y Smad4 a elementos críticos inducibles por TGF β en el promotor del activador del plasminógeno humano gen inhibidor de tipo 1, (1998), EMBO J, 17 (11): 3091-3100). Brevemente, las células HEK293 se cotransfectaron con los constructos BRE (BRE-Id1-luc) o CAGA-luciferasa (p (CAGA)₁₂-MLP-luc) y el constructo de renilla-luciferasa (Promega pGL4.74 [hRluc/TK]) durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con miostatina y activina (para la inducción de la vía de Smad 2/3, informador de CAGA-luciferasa) o BMP-9 y BMP-10 (para la inducción de la vía de Smad 1/5/8, informador de BRE-luciferasa) con o sin una serie de concentraciones de folistatina. Después de una incubación durante la noche, la señal de luciferasa se determinó utilizando el kit de ensayo Promega Dual-Glo, con valores normalizados para el control de la renilla. En este experimento, se ensayaron la folistatina nativa (R&D Systems) y las proteínas de fusión folistatina Fc (Sino Biological FS315-hFc, FS315-GAG3-mFc). FS315-GAG3-mFc se muestra a continuación.

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMIFNGGAP
NCIPCKETCENVDCGPGK~~K~~CRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNEC
 ALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASS
 10 EQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK
 VGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVVKHSGSCNSIS
 EDTEEEEEDEDQDYSPFISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGG
 GGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT
 15 CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEF
 KCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVE
 WQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT
 20 EKSLSHSPGK (SEQ ID NO:13)

[0138] Los resultados ejemplares del ensayo de BRE-luciferasa se muestran en la FIG. 1. FS315-Fc no inhibe la señalización BMP-9 o -10 a través de la ruta Smad 1/5/8.

25 **[0139]** Los resultados ejemplares del ensayo de luciferasa CAGA se muestran en la FIG. 2. Tanto FS315 como FS315-GAG3-mFc mostraron una potente inhibición de la señalización de Smad2/3 a dosis de 0,1 nM y superiores en comparación con la cantidad de inducción de Smad 2/3 observada después de la administración de niveles fisiológicamente relevantes de miostatina (1,2 nM) y activina (0,4 nM), activadores conocidos de Smad 2/3. Estos resultados indican que la folistatina es un inhibidor potente y específico de la actividad de miostatina y activina. La presencia de la fusión Fc no afectó perjudicialmente a la potencia de la folistatina, como lo indican las curvas inhibitorias similares entre la molécula FS315 nativa y la proteína de fusión FS315-GAG3-mFc. De forma inesperada e importante, la proteína de fusión Fc de acuerdo con la presente invención aumenta significativamente la afinidad de unión de la folistatina a la miostatina diana primaria (p. ej., al menos 10 veces como se muestra en la Tabla 3).

35 ***Ejemplo 2. La proteína de fusión de folistatina FS315-GAG3-mFc tiene una vida media sérica extendida***

40 **[0140]** Antes de nuestra invención, se informó que la folistatina tiene una vida media corta en el suero, lo cual es una preocupación para el desarrollo de la folistatina como una proteína terapéutica. Por ejemplo, la proteína FS315 comercial típica tiene una vida media en suero de aproximadamente una hora. En este Ejemplo, se determinó la vida media *in vivo* de la proteína de fusión FS315-GAG3-mFc y tiene una vida media en suero significativamente extendida.

45 **[0141]** En concreto, una región de control de impresión (ICR) de ratón se seleccionó como modelo y ¹²⁵I marcado con FS315-GAG3-mFc se administró por vía subcutánea a 1,0 mg/kg (~2 µCi/animal). Después de la administración, se tomaron muestras de suero y tejidos hasta 10 días después de la inyección. Los tejidos muestreados fueron: tiroides, hígado, riñón, pulmón, bazo, diafragma, corazón, cuádriceps y tríceps. Los resultados ejemplares de las muestras de suero se muestran en la FIG. 3A. Como puede verse, la vida media sérica de FS315-GAG3-mFc es de aproximadamente 5 días, lo que es sorprendentemente prolongada en comparación con la vida media sérica corta de folistatina (aproximadamente 1 hora) conocida en la técnica. Los resultados ejemplares del perfil de PK a través de diversos tejidos se muestran en la FIG. 3B y la Tabla 4. La vida media de Folistatina-Fc, con la excepción de la tiroides, es entre dos y cinco días a través de los tejidos. De nuevo, el perfil de vida media del tejido extendido es inesperado.

55 **[0142]** Los datos extendidos de la vida media *in vivo* confirman que la folistatina puede ser una proteína terapéutica efectiva para el ratamiento de la DMD.

60

65

Tabla 4. Datos PK de FS315-GAG3-mFc ejemplar in vivo

Tejido	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/g tejido o ng/mL suero)	AUC _{0-último} (h/ng/g tejido o ng/mL suero)	AUC _{0-∞} (h/ng/g tejido o ng/mL suero)
Suero	134	14,0	557	782
Tiroides	118	467,4	57019	71769
Riñón	77	9,8	221	249
Hígado	48	4,4	118	127
Pulmón	116	3,9	106	136
Bazo	95	5,8	72	83
Corazón	105	1,6	46	55
Diafragma	99	1,0	28	33
Triceps	78	1,7	44	50
Cuadríceps	99	0,8	25	31

Ejemplo 3. Eficacia in vivo de FS315-GAG3-mFc

[0143] Este ejemplo demuestra que la administración de la folistatina (p. ej., FS315-GAG3-mFc) al modelo de ratón MDX de distrofia muscular Duchenne resulta en una tendencia de aumento de masa muscular incluso a una dosis baja de 1 mg/kg. En este ejemplo, los términos "FS315-GAG3-mFc", "FS315-Fc" y "FS315-mFc" se usan indistintamente.

[0144] Específicamente, en este estudio, 45 mdx ratones fueron tratados con un vehículo vacío, 0 mg/kg, 1,0 mg/kg u 8 mg/kg FS315-GAG3-mFc. Los animales en el vehículo o en los grupos de tratamiento recibieron dos inyecciones subcutáneas (interescapulares) por semana durante la duración del estudio y los niveles de proteína de fusión de folistatina se evaluaron mediante un muestreo retroorbitario.

[0145] La mitad de los animales de control tratados con vehículo se sacrificaron con el grupo FS315-Fc de 1 mg/kg, y los animales restantes tratados con vehículo, junto con los animales de control sin tratar, se sacrificaron con el grupo de tratamiento de 8 mg/kg. El programa de tratamiento ejemplar fue el que se muestra en la Tabla 5A y B:

Tabla 5. Ejemplo de inyección y programa de muestreo en ratones mdx

5A: 1 mg/kg FS315-GAG3-mFc curso de tratamiento	
Evento	Día
Pre-sangrado, Inyección 1	0
Inyección 2	3
Muestra de sangre tomada, Inyección 3	7
Inyección 4	10
Muestra de sangre tomada, Inyección 5	14
Inyección 6	17
Muestra de sangre tomada, Inyección 7	21
Inyección 8	24
Muestra de sangre tomada, Inyección 9	29
Sacrificio, semana 4 punto de tiempo	30
Inyección 10	32
Muestra de sangre tomada, Inyección 11	35
Inyección 12	38
Muestra de sangre tomada	44
Inyección 13	45
Inyección 14	49
Muestra de sangre tomada, Inyección 15	52
Inyección 16	56
Muestra de sangre tomada, Inyección 17	59
Inyección 18	63
Inyección 19	66
Muestra de sangre tomada	70
Sacrificio final, semana 10	71
5B. 8 mg/kg FS315-GAG3-mFc curso de tratamiento	
Evento	Day
Pre-sangrado	0
Inyección 1	1
Inyección 2	5
Muestra de sangre tomada, Inyección 3	8
Inyección 4	12
Muestra de sangre tomada, Inyección 5	15
Inyección 6	19
Inyección 7	22
Inyección 8	26
Muestra de sangre tomada, Inyección 9	30
Inyección 10	33
Inyección 11	37
Inyección 12	41
Muestra de sangre tomada	43
Sacrificio final, semana 6	44

[0146] Datos a modo de ejemplo respecto a los pesos musculares en el vehículo tratados frente a 1 mg/kg de grupo FS315-Fc se muestran en la FIG. 4. Específicamente, la FIG. 4 muestra los pesos musculares para el cuádriceps (FIG. 4A), gastrocnemio (FIG. 4B), tibial anterior (FIG. 4C) y tríceps (FIG. 4D) en gramos después de 4 y 10 semanas de tratamiento con 1 mg/kg, y 6 semanas de tratamiento con 8 mg/kg. Los datos de peso muscular se ajustan al peso corporal basal.

[0147] Los datos ejemplares de los niveles circulantes de folistatina después de la administración se muestran en la FIG. 5. Específicamente, la FIG. 5A muestra los niveles de FS315-mFc en el suero de animales tratados con inyecciones dos veces por semana de 1 mg/kg, y la FIG. 5B muestra los niveles de FS315-mFc en el suero de animales tratados dos veces a la semana con 8 mg/kg.

[0148] Como se muestra en las FIGS. 4-5, hay una clara indicación de que FS315-Fc aumenta la masa muscular en modelos animales de DMD.

Ejemplo 4. Eficacia in vivo de la proteína de fusión de folistatina-Fc recombinante

[0149] Este ejemplo demuestra que la administración de una proteína de fusión folistatina-Fc da como resultado la hipertrofia del músculo (p. ej., aumento de la masa muscular y diámetros miofibras) *in vivo*.

[0150] En este estudio, tanto C57BL/10 como ratones mdx fueron inyectados con FS315-GAG3-mFc directamente en el músculo gastrocnemio (intramuscular, IM). Específicamente, cada ratón recibió 2 inyecciones, una en cada lado, dos veces por semana. El gemelo izquierdo recibió 20 µl de una solución de 1 mg/ml de FS315-GAG3-mFc para un total de 20 µg de proteína por inyección. El gastrocnemio derecho recibió 20 µl de PBS (control del vehículo). Las inyecciones se produjeron dos veces por semana durante un total de 4 semanas. 24 h después de la inyección final, los ratones se sacrificaron y los músculos del gastrocnemio se diseccionaron y pesaron cuidadosamente. Se incluyó como control positivo un grupo que recibió la quimera de ratón del receptor Fc de activina soluble (sActRIIB-mFc, R&D Systems) en la misma dosis. Además, se incluyeron ratones no tratados como control negativo.

[0151] La FIG. 6 muestra un aumento significativo de la masa muscular en ambos ratones de control C57 así como en ratones mdx después de un tratamiento dos veces por semana con 20 µg de FS315-mFc o sActRIIB-mFc. El diseño del estudio y los datos numéricos representados en la FIG. 6 se muestran en la Tabla 6 a continuación:

Tabla 6. Peso muscular

Tensión	Grupo	N	Prueba Gastroc Peso (g)	PBS Gastroc Peso (g)	Prueba-PBS Gastroc Peso (g)	P- Valor**
C57	FS315- mFc*	8	0,17 ± 0,016 (0,18)	0,15 ± 0,013 (0,16)	0,02 ± 0,013 (0,024)	0,02
	sActRIIB- mFc	8	0,18 ± 0,016 (0,17)	0,16 ± 0,02 (0,16)	0,019 ± 0,017 (0,016)	0,09
	No tratado	5	0,16 ± 0,013 (0,15)	0,16 ± 0,0074 (0,16)	0,0032 ± 0,012 (0,003)	>0,99
mdx	FS315- mFc	10	0,19 ± 0,017 (0,18)	0,17 ± 0,019 (0,16)	0,021 ± 0,013 (0,018)	0,005
	sActRIIB- mFc	8	0,21 ± 0,024 (0,2)	0,19 ± 0,026 (0,19)	0,024 ± 0,017 (0,018)	0,04
	No tratado	5	0,16 ± 0,019 (0,16)	0,17 ± 0,023 (0,17)	-0,0084 ± 0,0055 (- 0,06)	0,16

* Todas las construcciones de folistatina utilizadas en este ejemplo contienen un enlazador GAG3.
 ** Los valores de P se obtuvieron de la prueba t pareada y se corrigieron con Bonferroni (corrigiendo para 6 pruebas estadísticas)

[0152] Diámetros de miofibras se determinaron a través de la exploración de deslizamiento digital del músculo gastrocnemio inyectado. Las muestras se fijaron en solución salina tamponada neutra al 10%, se procesaron y se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 µm, y se tiñeron con aglutinina de germen de trigo conjugada con Alexa fluor 488 (WGA), un método que tiñe las membranas de las células musculares. Las imágenes escaneadas se analizaron utilizando un software de análisis de imágenes (ImageScope e ImagePro Plus). Para cada miofibras, el diámetro promedio se determinó midiendo la longitud de la sección transversal de miofibras en intervalos de 2 grados, pasando a través del centroide de miofibras.

[0153] De acuerdo con la FIG. 6, la Fig. 15 demuestra un aumento en los diámetros de miofibras del músculo gastrocnemio tratado con FS315-mFc. Este aumento se produjo tanto en los ratones C57 (WT, Figura 15A) como en los ratones mdx (Figura 15B). La demostración del cambio a diámetros más grandes indica que el aumento de los pesos musculares es una consecuencia de la hipertrofia muscular. La Tabla 7 es un resumen de los cambios de diámetro promedio ejemplares y el análisis estadístico correspondiente.

Tabla 7

DIÁMETRO MEDIO			
Contraste (comparación)	Dif media	Error estándar	pag
WT FS315-mFc vs vehículo	12,5	0,8	<0,0001
ndx FS315-mFc vs vehículo	5,3	1,2	<0,0001
Sin inyección WT vs mdx	14,6	5,8	0,04

[0154] El modelo estadístico utilizado fue un modelo lineal jerárquico (HLM), que es capaz de dar cuenta de las múltiples mediciones realizadas dentro de cada animal. Las diferencias entre las piernas no tratadas y las tratadas dentro de cada cepa y el grupo de tratamiento son altamente significativas ($p < 0,0001$, que corroboran los datos de peso muscular).

[0155] Estos datos demuestran que la folistatina, en particular, la proteína de fusión folistatina-Fc puede inducir efectivamente el crecimiento muscular y tratar la atrofia muscular asociada con la DMD.

Ejemplo 5. Eficacia *in vivo* de variantes de folistatina ejemplares

[0156] La vida media *in vivo* y los datos de eficacia sobre la base de la proteína FS315 folistatina de tipo salvaje se muestra en los Ejemplos 2-4 demuestran que la folistatina puede ser usada como una terapia de proteína eficaz para DMD. Este ejemplo demuestra que las proteínas terapéuticas también se pueden desarrollar en base a variantes de folistatina.

[0157] Específicamente, se generaron deleciones del dominio de la folistatina o mutaciones puntuales como se describe en la Tabla 8 a continuación y se ensayó su eficacia de regeneración muscular utilizando un sistema de administración de IM/AAV bien establecido para facilitar la comparación entre las variantes y la folistatina de tipo salvaje.

[0158] En este estudio, se utilizaron un total de 35 C57 ratones de 3-4 semanas a través de siete grupos. Los siete grupos incluyeron cinco ratones cada uno, con cinco variantes de folistatina ensayadas (Tabla 8), y FS315 de tipo salvaje y un vector vacío utilizado como control. El gen que codifica para FS315 tiene 29 aminoácidos adicionales que representan el péptido señal que se escinde tras la secreción de la célula. Por lo tanto, FS315 y FS344 se refieren a la misma construcción de tipo salvaje y se usan indistintamente en los ejemplos a continuación.

Tabla 8. Evaluación de la eficacia de variantes de folistatina ejemplares

Variante	Mutación
dFSD2	Eliminación del dominio 2
dFSD3	Eliminación del dominio 3
FSD1/1/3	Eliminación del dominio 2, reemplazo con el dominio 1
Y185A	Punto mutante/Dominio 2
L191D	Punto mutante/Dominio 2

[0159] Las variantes de folistatina se administraron a través de una sola inyección unilateral en el cuádriceps izquierdo y gastrocnemio izquierdo usando un vector de AAV9 a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} partículas virales por animal. Los siguientes puntos finales se examinaron a las 2, 4 y 6 semanas posteriores a la inyección: niveles de folistatina en suero y orina, peso del ratón, pesos musculares individuales (grupos musculares tanto inyectados como distales) e histología (p. ej., recuento de fibras, tamaño y tipo, etc.). El músculo contralateral sirvió como un comparador intra-animal para este estudio.

[0160] Como se muestra en la FIG. 7, tanto el tipo salvaje FS315 como el mutante de eliminación del dominio 3 aumentaron significativamente el peso corporal en comparación con el control de vector vacío. En particular, la variante de folistatina eliminada del dominio 3 ensayado aumenta el peso corporal tan pronto como 3 semanas después de la inyección.

[0161] La FIG. 8 muestra pesos musculares promedio ejemplares de A) gastrocnemio y B) cuádriceps tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral dos semanas después de la inyección. Tanto el FS315 de tipo salvaje como las variantes de folistatina con supresión del dominio 3 mostraron un aumento significativo de la masa muscular en el lado ipsilateral en la semana 2 después de la inyección (Figura 8). En particular, los músculos inyectados con FS315 y dFSD3 tenían un peso de 60% a 70% mayor en comparación con el vector vacío (Figura 8). El músculo quad disecado que se inyectó con dFSD3 fue notablemente más grande que el músculo contralateral no tratado en la semana 2 (FIG. 9).

[0162] En la semana 4, el dominio 3 eliminó y folistatina de tipo salvaje aumentó de masa muscular, tanto en músculo inyectado como distal. Ver FIG. 10. Como se observó en la semana 2, el dFSD3 causó un efecto hipertrófico significativo en la semana 4, con una masa muscular notablemente mayor en el músculo inyectado en comparación con el lado no tratado (FIG. 11). Los niveles de folistatina en suero, determinados por ELISA, fueron similares para los ratones tratados con tipo salvaje y con dFSD3, y promediaron 30 ng/ml en las semanas 2, 4 y 6 (datos no mostrados).

[0163] El tamaño de miofibras también se determinó en tejidos musculares tanto inyectados como distales en la

semana 2, 4 y 6 después de la inyección usando histológico estándar y métodos inmunohistoquímicos. Los resultados ejemplares de las semanas 2, 4 y 6 se muestran en la Figura 12, 13 y 14, respectivamente. Todas las estadísticas se realizaron utilizando ANOVA de 1 vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnett en GraphPad Prism. Las barras de error representan SEM.

[0164] Como se muestra en la Figura 12, en la semana 2, en los músculos inyectados, se observó miofibras hipertrofia en Quad en el FS344 (23%), dFSD3 (30%), grupos Y185A y L191D y en Gastroc en los grupos FS344 (17%) y dFSD3 (25%). En los grupos musculares distales, se observó hipertrofia de miofibras en la AT en el grupo dFSD2 (12%). No se observó hipertrofia en el tríceps o diafragma.

[0165] Como se muestra en la Figura 13, en la semana 4, en los músculos inyectados, se observó miofibras hipertrofia en Quad en el FS344 (41%), dFSD3 (50%), grupos dFSD113 y L191D y en gemelo en el FS344 (42%), dFSD2, dFSD3 (73%), dFSD113, grupos Y185A y L191D. En los grupos musculares distales, se observó hipertrofia en la AT en el grupo dFSD3 (10%) y en el diafragma en los grupos FS344 (23%) y dFSD2 (29%). No se observó hipertrofia en el tríceps.

[0166] Como se muestra en la Figura 14, en la semana 6, en los músculos inyectados, se observó hipertrofia de miofibras en Quad en el FS344 (41%), dFSD3 (30%), grupos Y185A y en Gastroc en FS344 (90%), dFSD3 (49%), Y185A, grupos L191D. En los músculos distales, se observó hipertrofia de miofibras en TA en los grupos FS344 (26%), dFSD3 (41%), dFSD113, Y185A y L191D y en Diafragma en el grupo dFSD3 (35%). Se observó una hipertrofia mínima en el tríceps.

[0167] Tomados en conjunto, estos resultados indican que se pueden desarrollar terapias con proteínas basadas en variantes de folistatina. Por ejemplo, las eliminaciones del dominio de la folistatina o las mutaciones puntuales pueden conservar o mejorar la eficacia de la regeneración muscular. Como se muestra arriba, la eliminación del dominio 3 puede ser una variante de folistatina particularmente útil para tratar la DMD.

Ejemplo 6. Eficacia sistémica de FS315-GAG3-mFc

[0168] Como se muestra en el Ejemplo 4, la inyección de FS315-mFc en el gastrocnemio resultó en el aumento de la masa muscular en comparación con los músculos de control. Este ejemplo muestra que la inyección sistémica de FS315-mFc también es capaz de inducir el crecimiento muscular en varios sitios distales al sitio de inyección. Todas las construcciones de folistatina utilizadas en este ejemplo contienen un enlazador GAG3.

[0169] Se utilizó un total de 20 ratones C57BL/6 en este estudio, la mitad de los animales recibieron una inyección subcutánea (interescapular) de PBS dos veces por semana durante 8 semanas (control) y la otra mitad recibió una inyección subcutánea (interescapular) de 10 mg/kg FS315-mFc dos veces por semana durante 8 semanas. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección y se midió el peso del cuadriceps izquierdo y derecho, el gastrocnemio, el tibial anterior y el tríceps, al igual que el peso corporal total del animal. La Tabla 9 a continuación describe el diseño experimental para este ejemplo.

Tabla 9. Diseño experimental.

Grupo	N	Cepa de ratón	Artículo de prueba	Ruta de inyección	Dosis	Horario de dosificación	Sacrificio (24 horas después de la última inyección)
A	10	WT C57BL/6	FS315- mFc	SC (Interescapular)	10 mg/kg	Dos veces semanalmente	4 semanas
B	10	WT C57BL/6	FS315- mFc	SC (Interescapular)	10 mg/kg	Dos veces semanalmente	8 semanas
C	10	WT C57BL/6	Vehículo (PBS)	SC (Interescapular)	N/A	Dos veces semanalmente	4 semanas
D	10	WT C57BL/6	Vehículo (PBS)	SC (Interescapular)	N/A	Dos veces semanalmente	8 semanas

[0170] La FIG. 16 muestra datos de peso corporal ejemplares a lo largo del curso de 8 semanas del estudio. Como se puede observar, los pesos corporales para los animales tratados con FS315-mFc fueron significativamente mayores que los animales de control tratados con vehículo, que comenzaron a las 2 semanas y continuaron durante el estudio de 8 semanas. FIG. 17 representa datos de peso muscular ejemplares. Los músculos del tríceps de los ratones tratados con FS315-mFc tuvieron un peso significativamente mayor en comparación con el control del vehículo tan pronto como en la semana 4. Después de 8 semanas de tratamiento, los grupos musculares tanto del tríceps como del cuadriceps demostraron aumentos significativos en el peso en comparación con el vehículo (FIG.

17). El tamaño de miofibra se determinó mediante el método descrito en el Ejemplo 4. La FIG. 18 muestra el porcentaje de aumento en el diámetro de miofibra para los grupos musculares de tríceps y cuádriceps en las semanas 4 y 8. Ambos grupos musculares demostraron un cambio hacia un mayor tamaño de miofibra después del tratamiento con FS315-mFc a las 4 y 8 semanas.

[0171] Además, los niveles séricos de folistatina aumentaron después de la inyección subcutánea. Por ejemplo, los niveles de FS315-mFc en los sueros de ratones tratados (mediante inyección subcutánea dos veces por semana) se muestran en la FIG. 19. Los niveles de FS315-mFc fueron más altos en el suero recolectado en las semanas 4 y 8 puntos de sacrificio, de acuerdo con la cantidad de tiempo entre la inyección de FS315-mFc y la recolección de suero (24 h). En estos puntos, los niveles séricos de FS315-mFc promediaron unos 200 ng/ml. Las hemorragias retro-orbitales bisemanales se recolectaron 3 días después de la inyección de FS315-mFc, y los niveles séricos de FS315-mFc promediaron entre aproximadamente 30 y 50 ng/ml.

[0172] Estos datos demuestran que la inyección sistémica de FS315-mFc (p. ej., inyección subcutánea) puede inducir efectivamente el crecimiento muscular en varios tejidos musculares en todo el cuerpo.

Ejemplo 7. Eficacia sistémica de la proteína de fusión Folistatina-Fc en un modelo de ratón DMD

[0173] Este ejemplo demuestra adicionalmente la eficacia sistémica en modelo de enfermedad DMD. En particular, como se muestra a continuación, la inyección sistémica de FS315-mFc redujo exitosamente la progresión de varios síntomas característicos de DMD, como necrosis muscular y/o fibrosis. Todas las construcciones de folistatina utilizadas en este ejemplo contienen un enlazador GAG3.

[0174] El modelo de ratón mdx se ha utilizado ampliamente como el modelo preclínico para la demostración de prueba de concepto de terapias candidatos para la DMD. Tanto los grupos musculares de las extremidades como el diafragma del ratón mdx muestran una patología extensa que tiende a aumentar con la edad. Dicha patología se caracteriza por áreas de infiltrado inflamatorio, necrosis y fibrosis en el músculo. FS315-mFc se ensayó en este modelo para evaluar su efecto sobre la progresión de la fibrosis en el músculo. Se utilizaron un total de 50 ratones mdx en este Ejemplo, con 20 animales que recibieron una inyección subcutánea de PBS, y 30 animales que recibieron una inyección subcutánea de 10 mg/kg FS315-mFc dos veces por semana durante 12 semanas. (ver tabla 10). Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección y se recogieron los tejidos para el análisis de necrosis y fibrosis (ver Tabla 11).

Tabla 10. Diseño experimental.

Gru po	N	Artículo de prueba	Ruta de inyección	Dosis	Horario de dosificación	Sacrificio (24 horas después de la última inyección)
A	15	FS315- mFc	SC	10 mg/kg	Dos veces semanalmente	6 semanas
B	10	PBS	SC	N/A	Dos veces semanalmente	6 semanas
C	15	FS315- mFc	SC	10 mg/kg	Dos veces semanalmente	12 semanas
D	10	PBS	SC	N/A	Dos veces semanalmente	12 semanas

Tabla 11. Recolección y procesamiento de tejidos.

Diafragma	Cuadriceps	Gastrocnemio	Triceps
1/2 congelado instantáneamente para análisis de proteínas	1 congelado instantáneamente para análisis de proteínas	1 congelado instantáneamente para análisis de proteínas	1 congelado instantáneamente para análisis de proteína
1/2 fijado en formalina para análisis histológico	1 fijado en formalina para análisis histológico.	1 fijado en formalina para análisis histológico.	1 fijado en formalina para análisis histológico

[0175] La FIG. 20 muestra el efecto ejemplar de FS315-mFc sobre la expresión de proteínas fibróticas a nivel de ARN. Específicamente, la TA-PCR del colágeno tipo I, la actina del músculo liso alfa y la repetición de la triple hélice del colágeno que contiene 1 proteína demostró una reducción significativa en la expresión de estas proteínas relacionadas con la fibrosis tan pronto como 6 semanas después del tratamiento SC dos veces por semana.

[0176] Las tablas 12 y 13 resumen la evaluación histopatológica de la necrosis (determinada por la evaluación de las

secciones teñidas con H&E) y la fibrosis (según lo determinado por la evaluación de las secciones musculares teñidas con colágeno I en el músculo del ratón mdx tratado con FS315-mFc) en las secciones de tejido muscular. Para los grupos tratados con FS315-mFc y con vehículo, hubo 15 y 10 animales en total por grupo, respectivamente. Como se indica en la Tabla 12, el tratamiento con FS315-mFc redujo significativamente la incidencia de necrosis en los músculos de las extremidades tan pronto como a las 6 semanas del inicio de las inyecciones dos veces por semana. Esta reducción de la necrosis se ilustra en las imágenes de las secciones de H&E a través del cuádriceps y el músculo tríceps (Figura 21). La incidencia de fibrosis, demostrada por la tinción con colágeno I de las secciones de tejido muscular, se redujo significativamente después de 12 semanas de tratamiento con FS315-mFc (véase también la Tabla 13). Esta reducción en la deposición de colágeno se ilustra en las imágenes de secciones de músculo teñidas con colágeno I (Figura 22).

[0177] Los resultados de este estudio demuestran que FS315-mFc puede tratar con éxito DMD mediante la reducción efectiva la progresión de la patología del músculo enfermo en el modelo de ratón DMD incluyendo, pero no limitado a, necrosis muscular y/o fibrosis.

Tabla 12. Incidencia de necrosis en el músculo mdx de ratón tratado con FS315-mFc (los valores de p indican el grado de significación entre el vehículo y FS315-mFc, utilizando la prueba exacta de Fisher)

	Semana 6 Quad p=0.001		Semana 12 Quad p=0.049	
Puntuación	Vehículo	FS315-mFc	Vehículo	FS315-mFc
Mínimo	10%	67%	30%	73%
Suave	40%	33%	70%	27%
Marcado	50%	0%	0%	0%
Puntuación	Vehículo	FS315-mFc	Vehículo	FS315-mFc
Mínimo	0%	53%	20%	73%
Leve	10%	33%	70%	20%
Marcado	90%	14%	10%	7%
	Semana 6 Gastroc p<0.001		Semana 12 Gastroc p=0.007	
Puntuación	Vehículo	FS315-mFc	Vehículo	FS315-mFc
Mínimo	0%	73%	20%	80%
Leve	40%	27%	60%	20%
Marcado	60%	0%	20%	0%

Mínimo: <5%; leve: <30%; marcado:> 30% en el área muscular total controlada

Tabla 13. Incidencia de fibrosis, (los valores p indican el grado de significación entre el vehículo y FS315-mFc, utilizando la prueba exacta de Fisher)

	Semana 12 Quad p=0.0001	
Puntuación	Vehículo	FS315-mFc
Mínimo	0%	80%
Leve	70%	20%
Marcado	30%	0%
	Semana 12 Tríceps p=0,001	
Puntuación	Vehículo	FS315-mFc
Mínimo	0%	67%
Leve	80%	20%
Marcado	20%	13%
	Semana 12 Gastroc p<0,0001	
Puntuación	Vehículo	FS315-mFc
Mínimo	0%	73%
Leve	20%	27%
Marcado	80%	0%

Mínimo: ~ 1%; leve: <5%; marcado:> 5% en el área muscular total controlada

Ejemplo 8 Eficacia in vivo de la proteína de fusión Fc con delección del dominio 3 de folistatina recombinante

[0178] Este ejemplo demuestra que una proteína de fusión Fc con supresión del dominio 3 de la folistatina (dFSD3) indujo eficazmente el crecimiento muscular in vivo, similar a la proteína de fusión folistatina-Fc de tipo salvaje. Todas las construcciones de folistatina utilizadas en este ejemplo contienen un enlazador GAG3.

[0179] Específicamente, la construcción eliminada del dominio 3 descrita en el Ejemplo 5 se fusionó con el mismo mFc que se usó para FS315-mFc. Además, se utilizó la misma secuencia del enlazador GAG3 para fusionar dFSD3 con mFc. Los ratones C57BL/10 se inyectaron con ambas proteínas de fusión directamente en el músculo gastrocnemio, como se describe en el Ejemplo 4. Los ratones se sacrificaron después de 4 semanas de inyecciones dos veces por semana de 20 µg de proteína de fusión, y el músculo gastrocnemio opuesto recibió el mismo volumen de PBS. 24 h después de la inyección final, los ratones tratados se sacrificaron y los músculos gastrocnemios inyectados se inyectaron y pesaron cuidadosamente. Como se indica en la Figura 23, la proteína de fusión dFSD3-GAG3-mFc condujo a un aumento significativo en la masa muscular sobre el control del vehículo, y el aumento fue similar al observado con FS315-mFc. Este ejemplo indica que una proteína de fusión Fc de eliminación del dominio 3 de folistatina (p. ej., dFSD3-GAG3-mFc) está activa *in vivo* y otro candidato terapéutico prometedor para el tratamiento con DMD.

Ejemplo 9. Ventaja de un enlazador más largo en la función de la folistatina

[0180] Este ejemplo demuestra que un enlazador más largo, en particular un enlazador que contiene al menos 10 aminoácidos, proporciona una ventaja inesperada en la función de la folistatina. Específicamente, este ejemplo muestra que la proteína de fusión FS315-GAG3-Fc (Fc murina y/o humana), que contiene un enlazador de 57 aminoácidos, es más potente en su capacidad para inhibir la miostatina y la activina en comparación con la proteína de fusión FS315-hFc disponible en el mercado de Sino Biological (Sino Biological Inc. Número de catálogo 10685-H02H), que contiene un enlazador de 9 aminoácidos ALEVLFGQP. La concentración de miostatina y activina utilizada para el ensayo de señalización fue de 1,2 nM. Como se indica en la FIG 24 y en la Tabla 14, las proteínas de fusión FS315-GAG3-mFc y FS315-GAG3-hFc inhiben la señalización de miostatina y activina en el ensayo CAGA-luciferasa en la misma medida que la FS315 nativa. En comparación, la proteína de fusión FS315-hFc disponible en el mercado (Sino Biological) es significativamente menos potente. Los CI_{50} calculados son los siguientes:

Tabla 14: Valores de CI_{50} ejemplares para la inhibición de la folistatina de la miostatina y la activina en el ensayo de indicador CAGA-luciferasa para la señalización de Smad2/3

Material	Ligando	CI_{50} (nM)
FS315 (R&D Systems)	Miostatina	0,45
FS315-GAG3-mFc	Miostatina	0,46
FS315-GAG3-hFc	Miostatina	0,68
FS315-hFc (Sino Biological)	Miostatina	2,99
FS315 (R&D Systems)	Activina	0,40
FS315-GAG3-mFc	Activina	0,36
FS315-GAG3-hFc	Activina	0,70
FS315-hFc (Sino Biological)	Activina	2,90

[0181] Sin querer **limitarse** a una teoría particular, es posible que un enlazador más largo (p. ej., un enlazador de 57 aminoácidos en esta construcción particular FS315-GAG3-Fc) entre la proteína FS315 y la región Fc pueda permitir más conformación nativa de FS315 en comparación con una proteína de fusión con un conector mucho más corto (p. ej., 9 aminoácidos), lo que permite la unión a ligandos objetivo y la inhibición de la señalización en un grado similar al observado con FS315 nativo. En comparación, la proteína FS315-hFc disponible en el mercado tiene un enlazador mucho más corto de 9 aminoácidos, con una separación significativamente menor entre la proteína Fc y la proteína FS315, lo que podría causar un efecto perjudicial sobre la conformación y la actividad fisiológica de FS315.

Ejemplo 10. La proteína de fusión de folistatina FS315-GAG3-hFc tiene una vida media sérica extendida

[0182] En este ejemplo, hemos demostrado que las proteínas de fusión folistatina previstas, en particular, las que tienen un enlazador más largo (p. ej., un enlazador con al menos 10 aminoácidos) tiene una vida media sérica extendida. Específicamente, por primera vez, demostramos aquí que un FS315 fusionado a Fc humano con el enlazador GAG3 (FS315-GAG3-hFc) tiene una vida media en suero prolongada cuando se administra por vía subcutánea (SC) en ratas Sprague-Dawley en una dosis única de 10 mg/kg. Después de la administración, el suero se recogió en puntos de tiempo que iban desde 15 min a 5 días. FS315-GAG3-hFc se midió en suero de rata utilizando un ensayo de descubrimiento de mesoescala (MSD) que captura el FS315 humano y detecta el dominio Fc humano de la proteína de fusión intacta en muestras de suero. Los niveles de FS315-GAG3-hFc en suero de rata

se muestran en la FIG. 25. Los parámetros de PK se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Datos de PK FS315-GAG3-hFc In Vivo

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-último} (h*ng/mL)	AUC _{0-∞} (h*ng/mL)
84	1372	48	114585	205803

[0183] En resumen, los ejemplos anteriores demuestran que la folistatina, incluyendo las variantes previstas, son altamente efectivas en la inducción de hipertrofia muscular y la atenuación de la necrosis muscular y la fibrosis en el modelo de enfermedad DMD mediante, por ejemplo, administración sistémica. Por lo tanto, la folistatina y las variantes proporcionadas pueden ser agentes terapéuticos de proteínas eficaces para el tratamiento de la DMD.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de folistatina recombinante para usar en un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en donde el método comprende
 5 administrar a un individuo que sufre o es susceptible de DMD una cantidad efectiva de una proteína de folistatina recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. NO: 1 o 2 fusionados a un dominio Fc a través de un enlazador peptídico que comprende 10 o más aminoácidos de manera que al menos un síntoma o característica de la DMD se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene un inicio retardado, y en donde el enlazador peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7.
- 10 2. Una proteína de fusión de folistatina recombinante que comprende
 un polipéptido de folistatina;
 un dominio Fc; y
 15 un enlazador que asocia el polipéptido de folistatina con el dominio Fc, en el que el polipéptido de folistatina comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2; en donde el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7; y además, en donde la proteína de fusión de folistatina recombinante es capaz de unirse a activina, miostatina y/o GDF-11 y tiene una vida media *in vivo* que varía de 0,5-10 días.
- 20 3. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o la proteína de fusión de folistatina recombinante de la reivindicación 2, en donde la proteína de folistatina recombinante comprende una eliminación de los residuos de aminoácidos 212-288 de la SEQ ID NO: 1.
- 25 4. La proteína de fusión de folistatina recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la proteína de fusión de folistatina recombinante de la reivindicación 2, en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1.
5. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, o la proteína de fusión de folistatina recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el dominio Fc comprende una
 30 secuencia de aminoácidos idéntica a

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 35 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSL
 40 SLSPGK (SEQ ID NO:3) .

6. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5, o la proteína de fusión de folistatina recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde la proteína de folistatina recombinante, o la proteína de fusión de folistatina recombinante, comprende un aminoácido.
 45 secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 8

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMIENGG
 APNCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGKPVCGLDGKTYR
 50 NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTNNAVCVTCNRIC
 PEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGG
 KKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLE
 55 VKHSGSCNSISEDTEEEEDQDYSPFISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPG
 GGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHHTCPPCPAPPELLGGPSVF
 LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 60 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8),
 65

ES 2 715 710 T3

SEQ ID NO: 9

5 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGG
APNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYR
NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA Y CVTCNRIC
10 PEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGG
KKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGV LLE
VKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPG
15 GGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
20 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9),

25 SEQ ID NO: 10

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGG
30 APNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYR
NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA Y CVTCNRIC
PEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI S I S E D T E E E E E D E D
35 QDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGG
GGGAAAAAGGGGGGAPKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
40 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY P
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHE
45 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10), o

SEQ ID NO: 11

50 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGG
APNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYR
NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA Y CVTCNRIC
55 PEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI S I S E D T E E E E E D E D
QDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGG
GGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
60 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHE
65 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:11).

7. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 o la proteína de fusión de folistatina recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que la proteína de folistatina recombinante se produce a partir de células de mamíferos, opcionalmente en donde las células de mamíferos son células humanas o células HT1080.

5 8. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7, en la que la proteína de folistatina recombinante se administra sistémicamente.

10 9. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8, en la que:

15 (a) la administración de la proteína de folistatina recombinante produce (i) regeneración muscular, aumento de la fuerza muscular, mayor flexibilidad, mayor movilidad, mayor resistencia a la fatiga, mayor flujo sanguíneo, mejora de la cognición, mejora de la función pulmonar, inhibición de la inflamación, reducción de la fibrosis muscular y/o reducción de la necrosis muscular, y/o (ii) reducción de la fibrosis muscular y/o necrosis, y/o

20 (b) al menos un síntoma o característica de la DMD se selecciona del grupo que consiste en desgaste muscular, debilidad muscular, fragilidad muscular, necrosis muscular, fibrosis muscular, contractura articular, deformación del esqueleto, cardiopatía, alteración de la deglución, deterioro de la función intestinal y vesical, isquemia muscular, deterioro cognitivo, disfunción del comportamiento, deterioro de la socialización, escoliosis y deterioro de la función respiratoria.

25 10. La proteína de folistatina recombinante para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-9, en la que la proteína de folistatina recombinante comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11.

11. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de folistatina recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7,

30 12. Una célula que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 11.

13. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de folistatina recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.

35

40

45

50

55

60

65

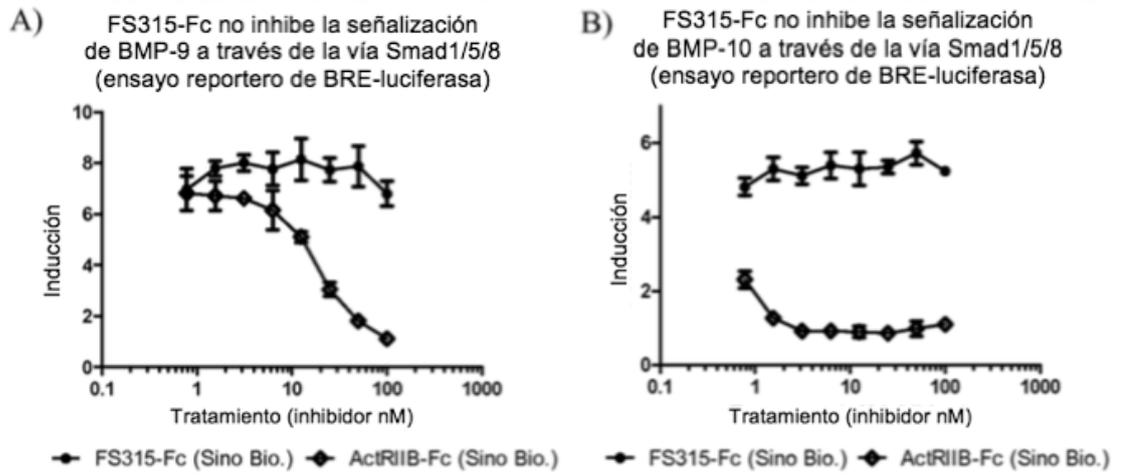
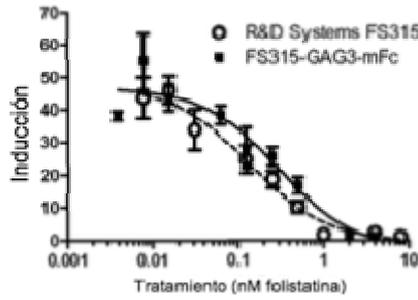


FIG. 1

FS315-Fc no inhibe señalización de BMP-9 o 10 a través de la vía Smad1/5/8 (ensayo reportero BRE-luciferasa)

A) FS315-GAG3-mFc inhibe la señalización de miostatina a través de la vía Smad2/3 (ensayo reportero de CAGA-luciferasa)



B)

FS315-GAG3-mFc inhibe la señalización de activina A a través de la vía Smad2/3 (ensayo reportero de CAGA-luciferasa)

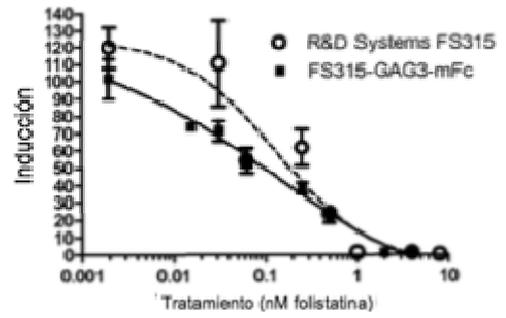


FIG. 2

FS315-GAG3-mFc inhibe señalización de miostatina y activina A a través de la vía Smad1/5/8 (ensayo reportero CAGA-luciferasa)

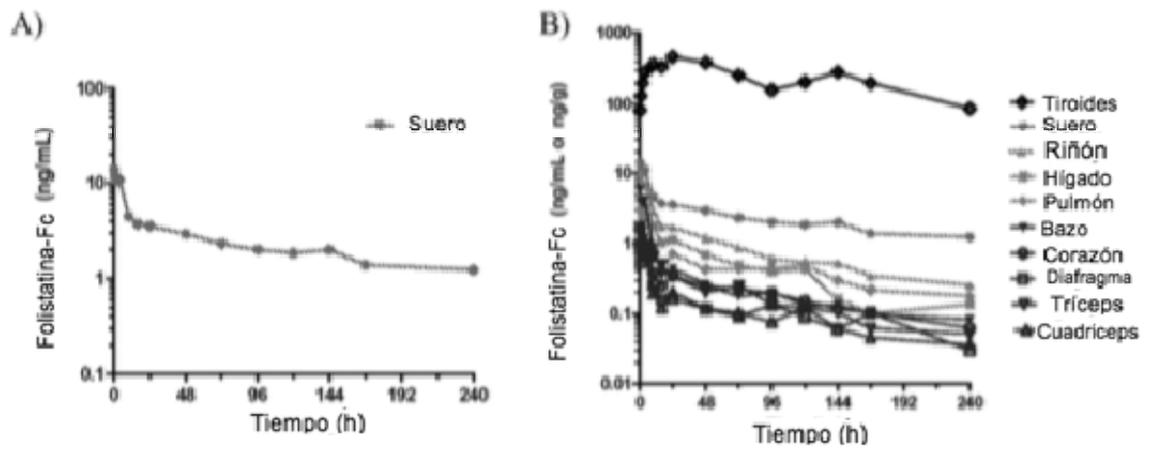


FIG. 3

Perfil PK de FS315-mFc en el suero de ratón y tejido después de la inyección de SC de 1 mg/kg. La vida media estimada de tejido es 2-5 días, vida media de suero ~ 5 días.

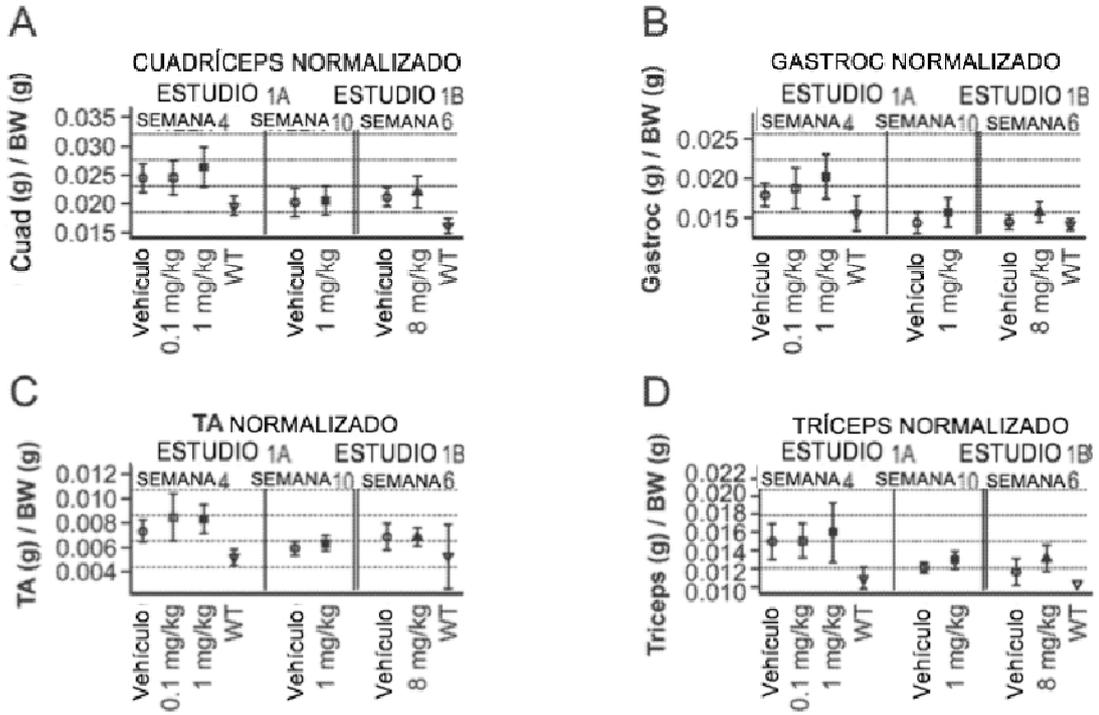
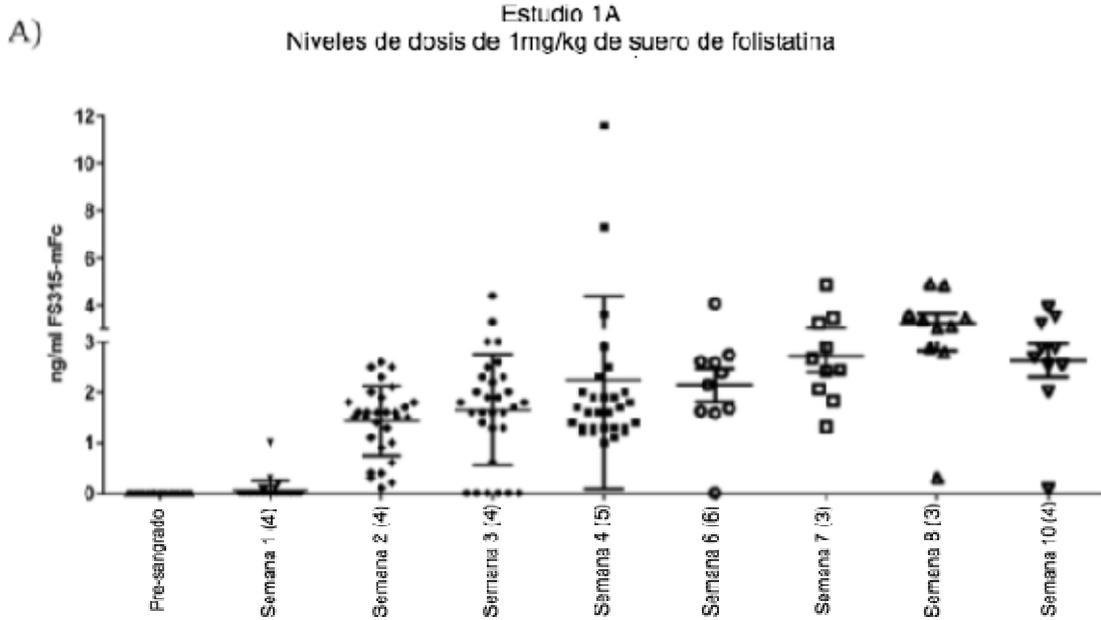
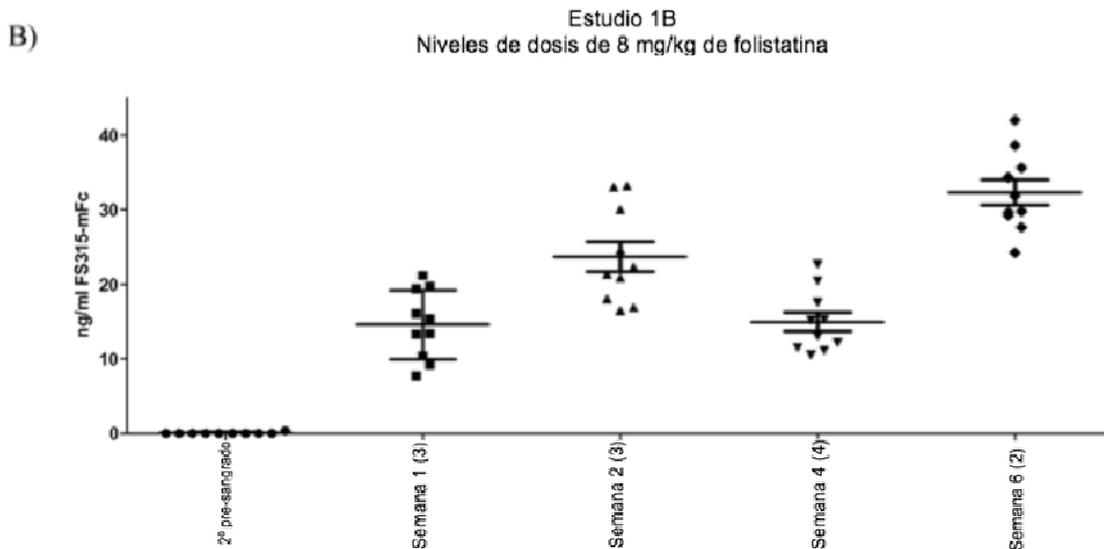


FIG. 4

Cambios en masa muscular después de administración de SC dos veces a la semana de FS315-mFc en ratones mdx. Los pesos musculares se normalizan al peso corporal de línea de base. Existe una tendencia para el peso muscular aumentado en ratones mdx tratados con 1 mg/kg durante 10 semanas o 8 mg/kg durante 6 semanas.



Número en paréntesis indica el número de días entre tiempo de inyección de folistatina y tiempo de muestreo de sangre para el ensayo de folistatina



Número en paréntesis indica el número de días entre tiempo de inyección de folistatina y tiempo de muestreo de sangre para el ensayo de folistatina

FIG. 5

Los niveles de FS315-mFc en suero de ratones mdx tratados con 1 mg/kg (A) y 8 mg/kg (B).

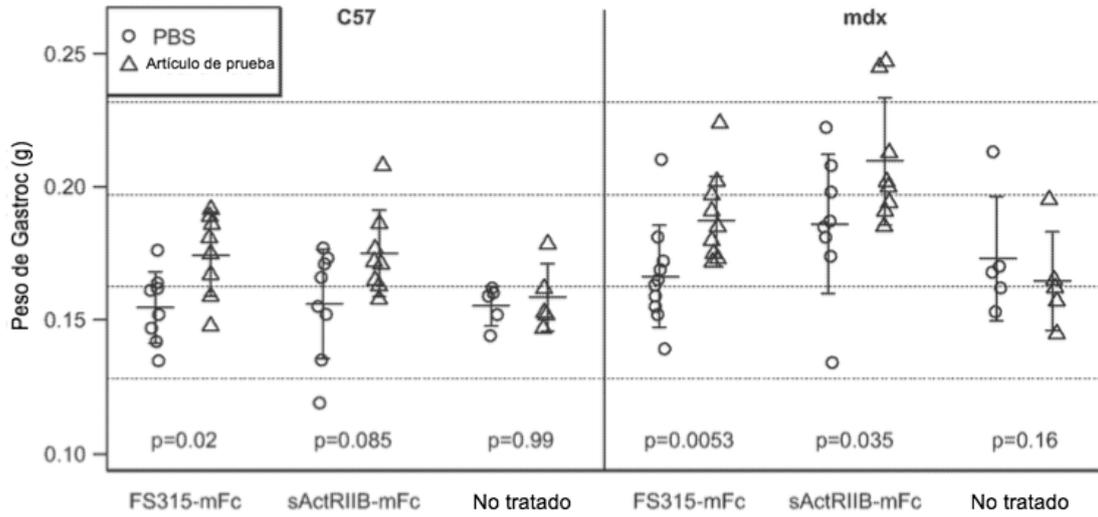


FIG. 6

El efecto de la inyección intramuscular de FS315-mFc en el peso muscular después de 4 semanas de la inyección dos días semanalmente de 20 µg directamente en el músculo gastrocnemio. El músculo gastrocnemio contra-lateral recibió un volumen equivalente de PBS y actúa como el control para cada grupo de tratamiento. El grupo no tratado no recibió inyecciones, y cada conjunto de datos para este grupo representa los músculos gastrocnémicos derecho e izquierdo. Los valores P obtenidos de la prueba t emparejada con la corrección de Bonferroni.

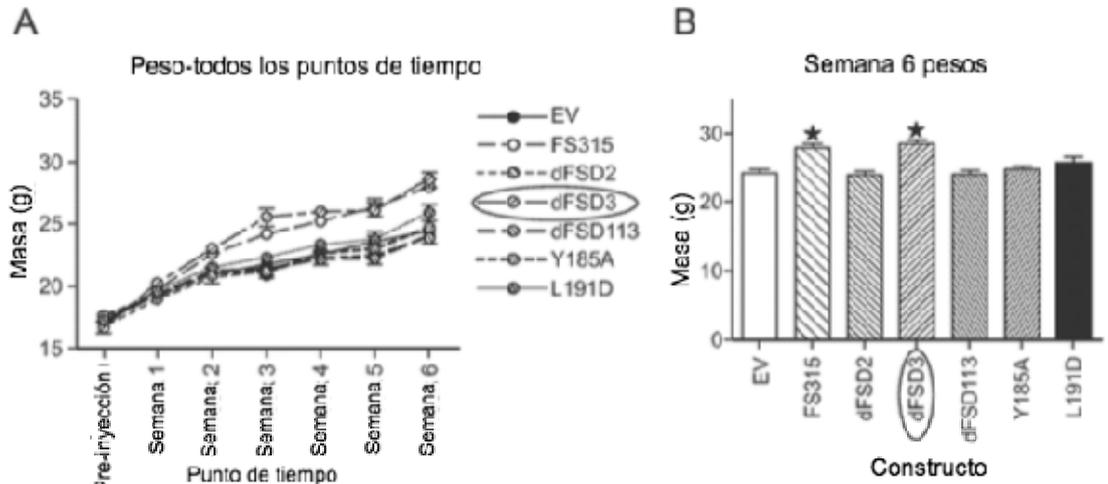


FIG. 7

Peso corporal semanal después de la administración de gen intramuscular de variantes de folistatina al músculo de gastrocnemio y cuadriceps de ratones C57.

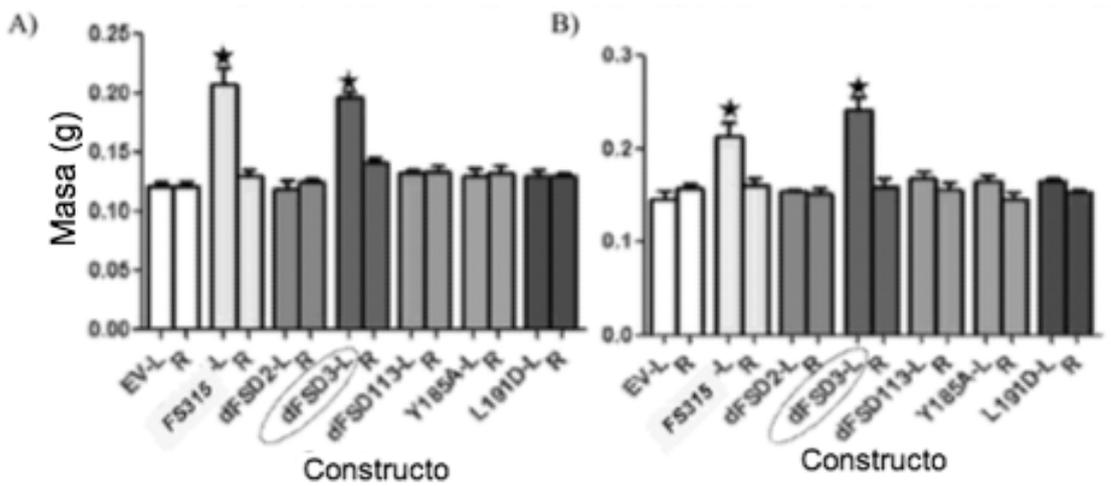


FIG. 8

Pesos musculares de semana 2 después de la administración de gen intramuscular de variantes de folistatina al músculo de gastrocnemio (A) y cuadriceps (B) de ratones C57.



FIG. 9

Morfología grande de semana 2 de músculo cuádriceps diseccionado que recibe dFSD3 a través de la administración génica directa. El músculo cuádriceps derecho no recibió una inyección de dFSD3.

Músculos inyectados

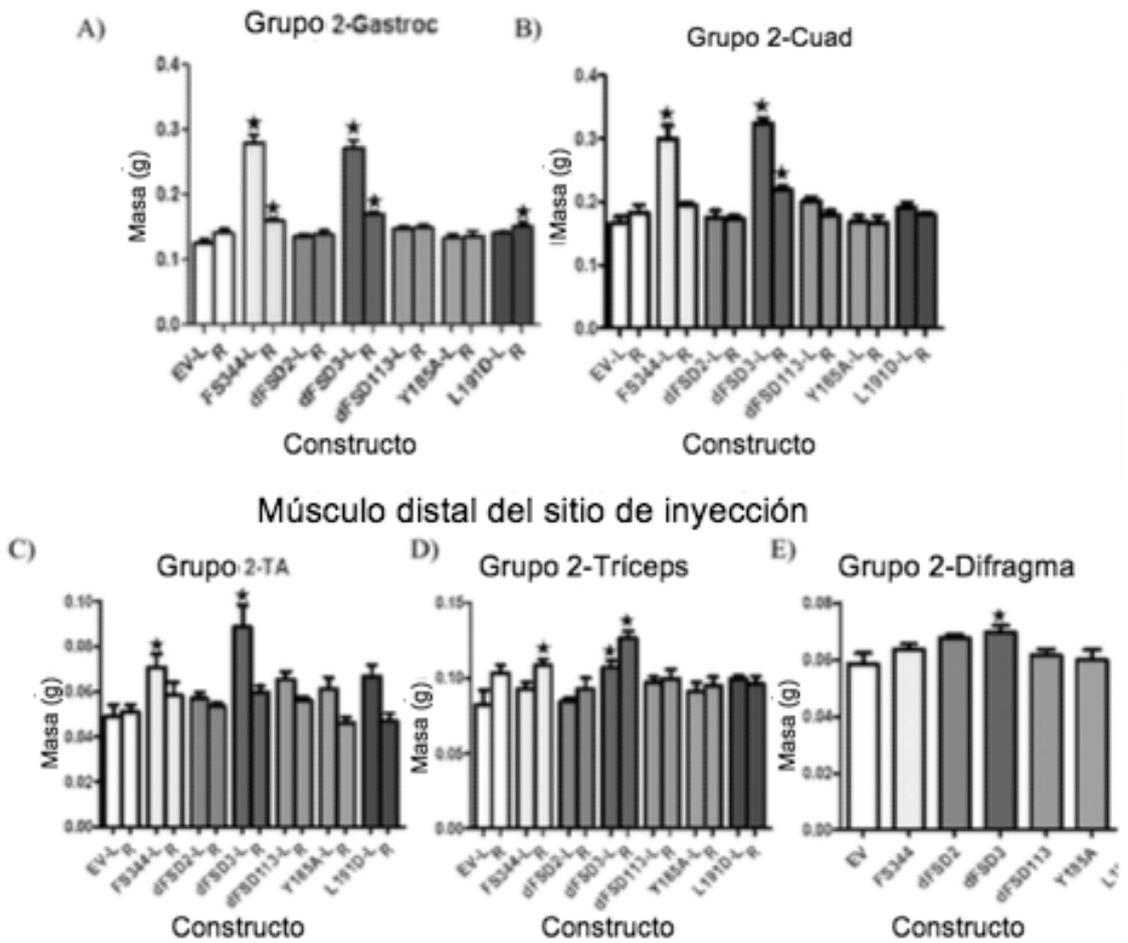


FIG. 10

Pesos musculares de semana 4 después de la administración génica intramuscular de variantes de folistatina al músculo de gastrocnemio (A) y cuádriceps (B) de ratones C57. Los siguientes músculos estaban alejados del sitio de inyección: C) tibial anterior, D) tríceps, E) diafragma.

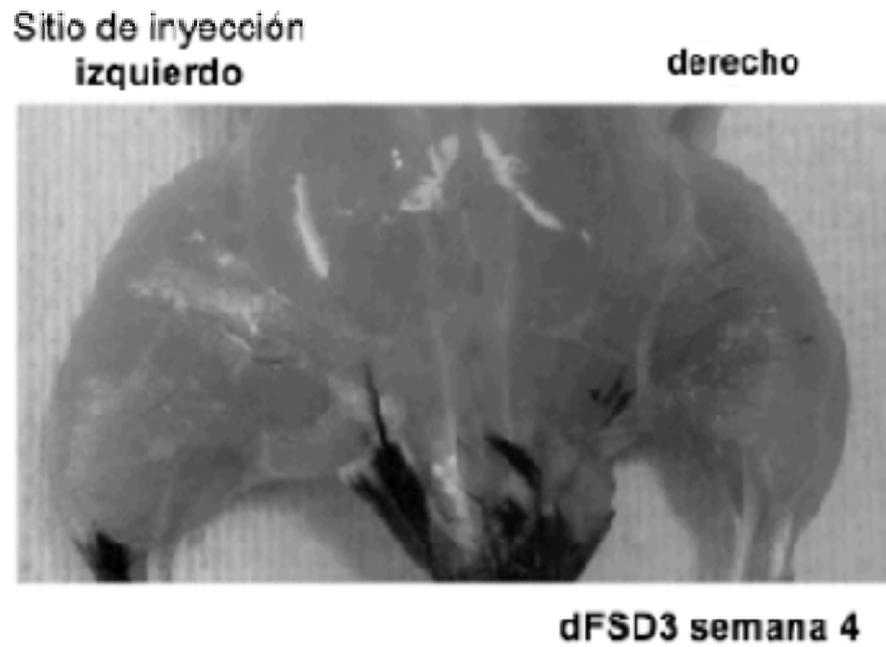
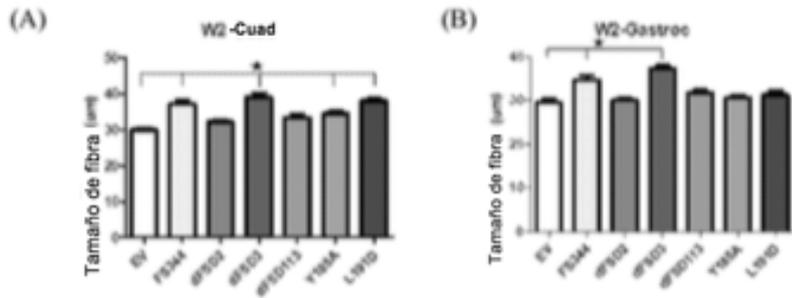


FIG. 11

Morfología grande de semana 4 de músculo cuadriceps que recibe dFSD3 a través de la administración génica directa. El músculo cuadriceps derecho no recibió una inyección de dFSD3.

Músculos inyectados



Músculos distales

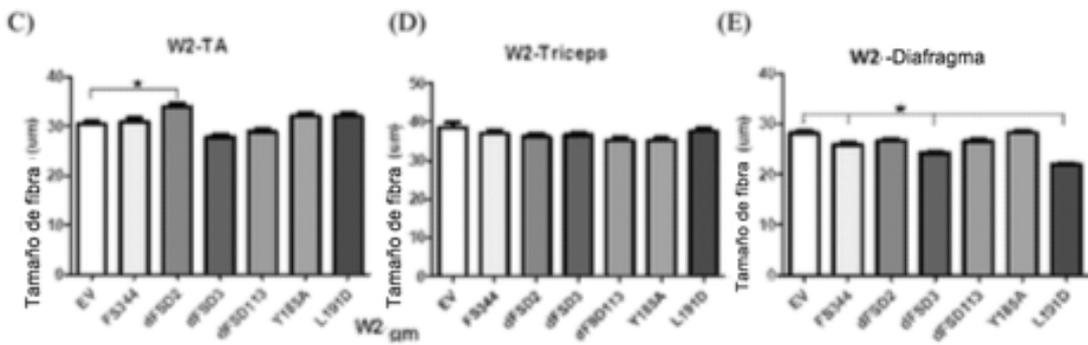


FIG. 12

Diámetro de miofibra de músculo de semana 2 después de la administración génica intramuscular de variantes a cuadriceps (A) y gastrocnemio (B) de ratones C57. Los siguientes músculos estaban alejados del sitio de inyección: C) tibial anterior, D) tríceps, E) diafragma.

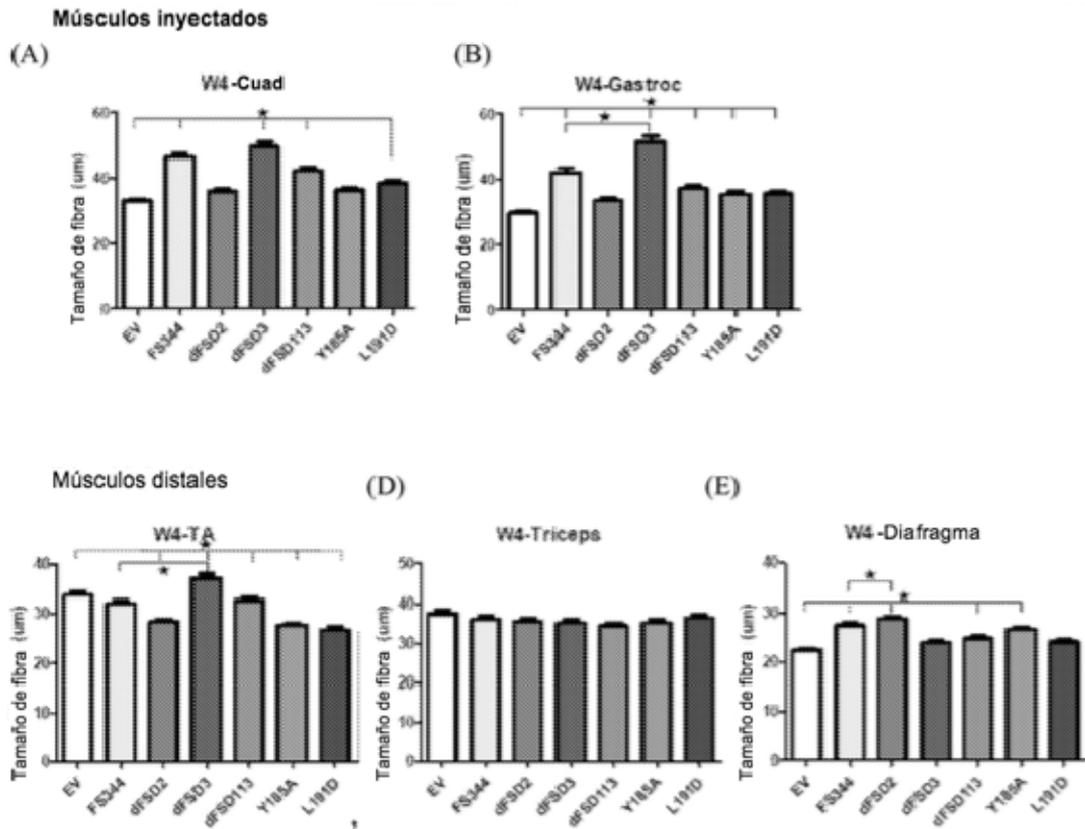
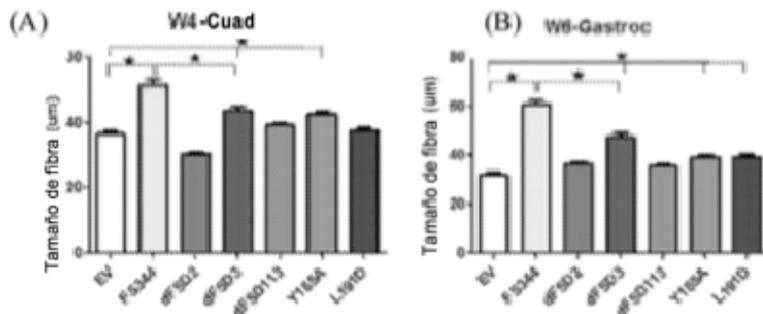


FIG. 13

Diámetro de miofibra de músculo de semana 4 después de la administración génica intramuscular de variantes de follistatina a cuádriceps (A) y gastrocnemio (B) de ratones C57. Los siguientes músculos estaban alejados del sitio de inyección: C) tibial anterior, D) tríceps, E) diafragma.

Músculos inyectados



Músculos distales

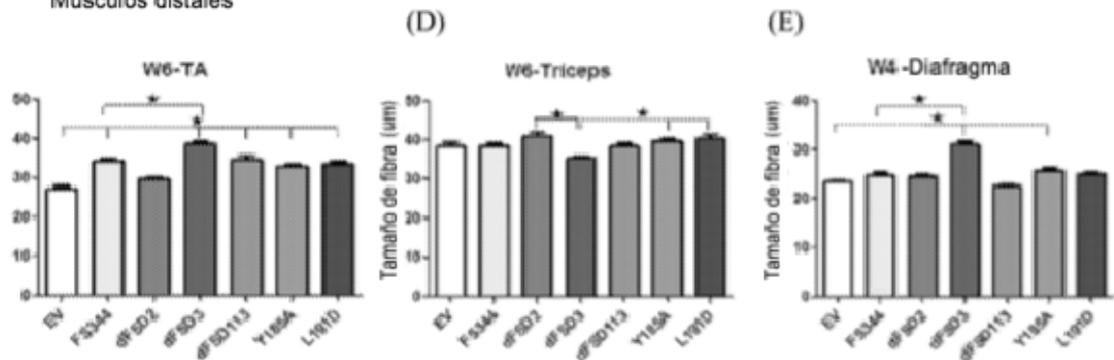
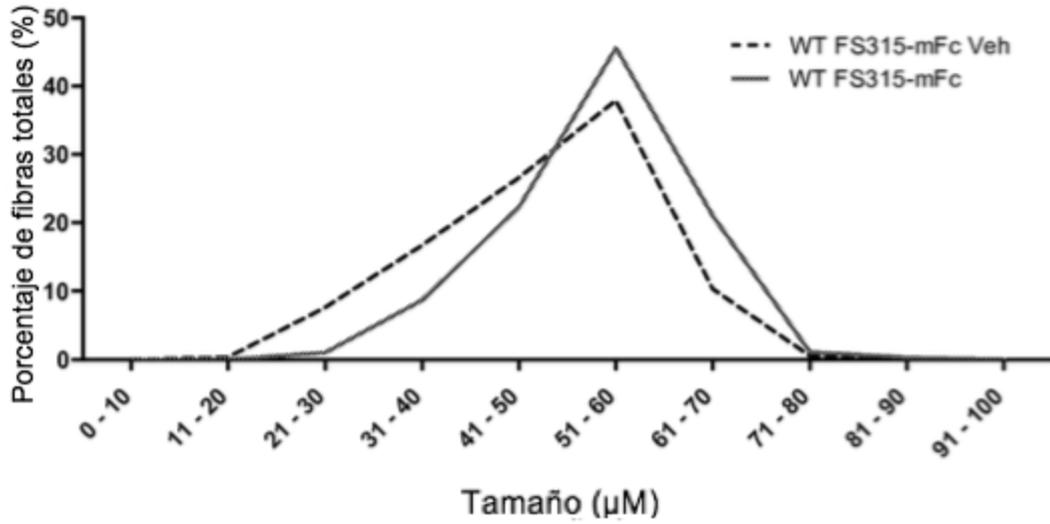


FIG. 14

Diámetro de miofibra de músculo de semana 6 después de la administración génica intramuscular de variantes de folistatina a cuadriceps (A) y gastrocnemio (B) de ratones C57. Los siguientes músculos estaban alejados del sitio de inyección: C) tibial anterior, D) tríceps, E) diafragma.

A)

Distribución de tamaño de miofibra de gastrocnemio en WT tratado con FS315-mFc



B)

Distribución de tamaño de miofibra de gastrocnemio en mdx tratado con FS315-mFc

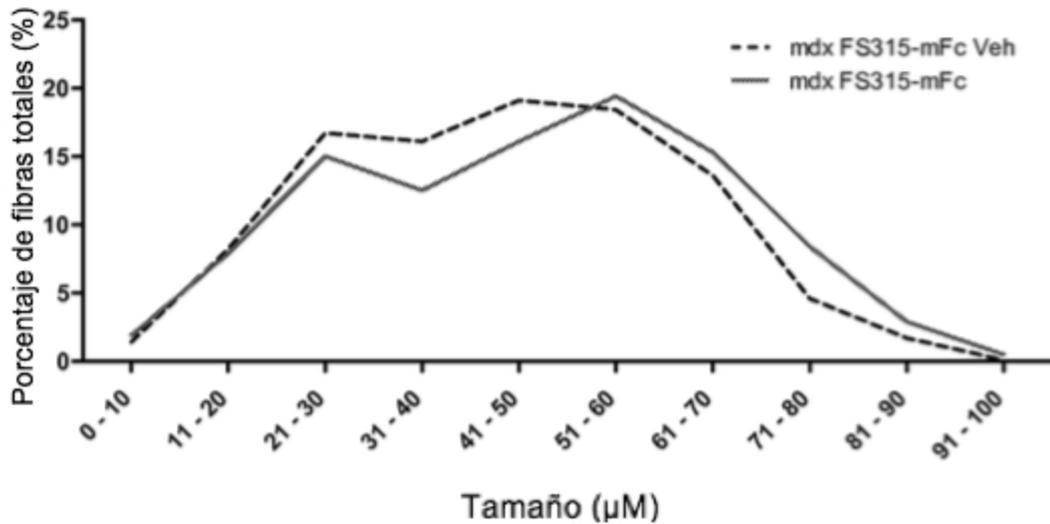


FIG. 15

Distribución de tamaño de miofibras después de la inyección intra-muscular FS315-mFc en el gastrocnemio de ratones C57 (WT) (A) o mdx (B).

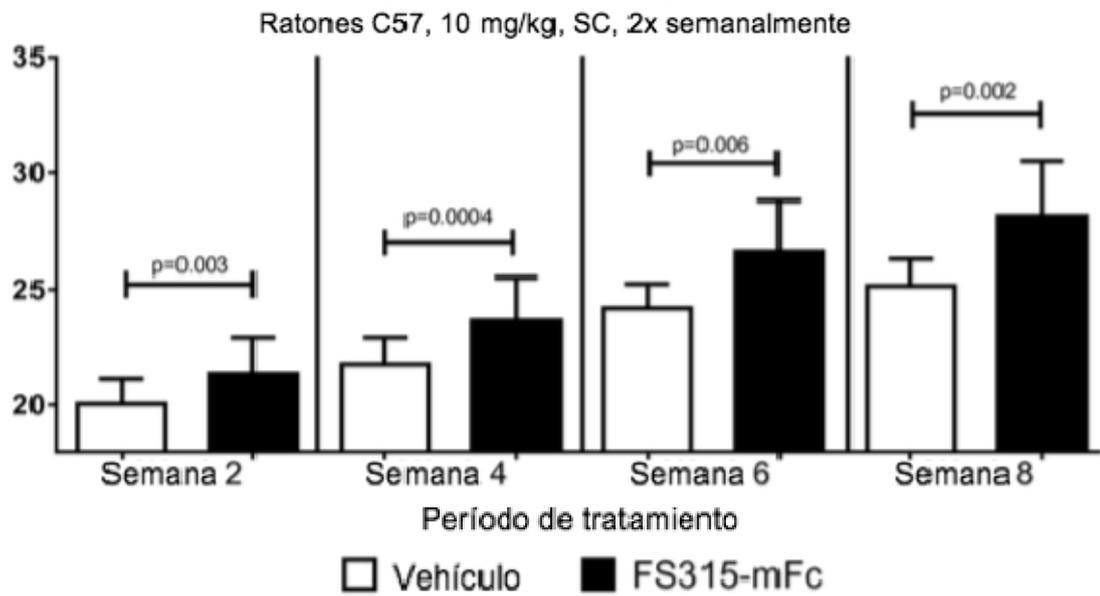


FIG. 16

Pesos corporales de ratones C57 tratados dos veces a la semana durante 8 semanas con 10 mg/kg de FS315-mFc a través de la inyección subcutánea. Los valores P se obtuvieron mediante la utilización de la prueba t no emparejada.

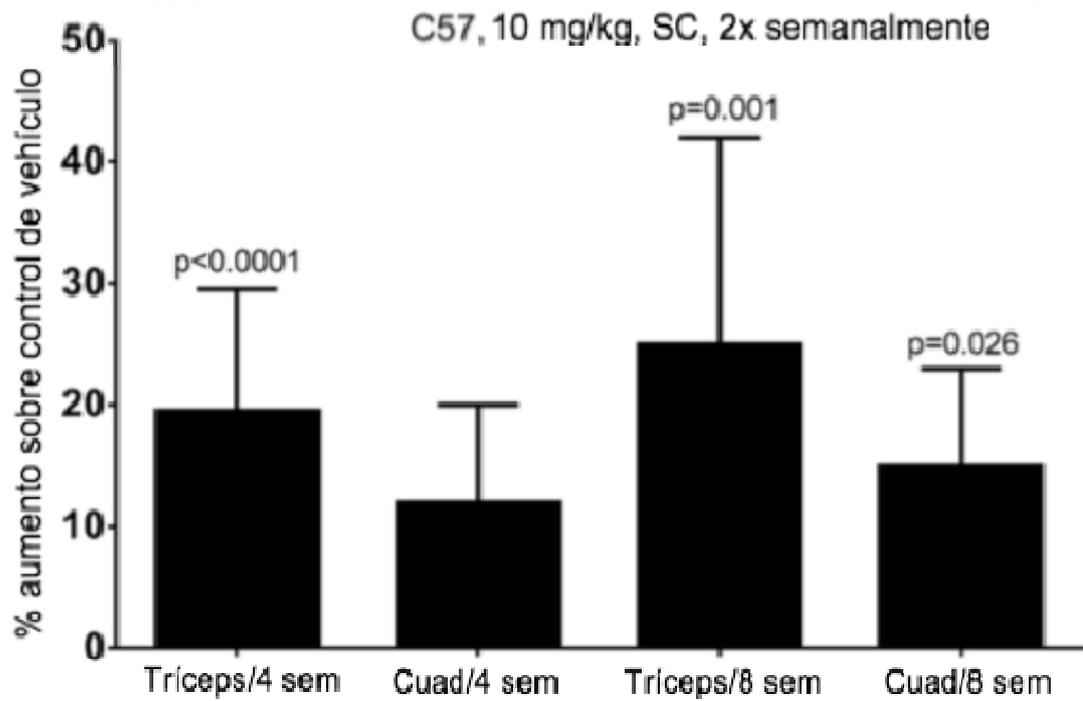


FIG.17

Cambio porcentual en peso para los músculos tríceps y cuádriceps en ratones C57 tratados con FS315-mFc durante las semanas 4 y 8. Los valores P se obtuvieron de la prueba t no emparejada.

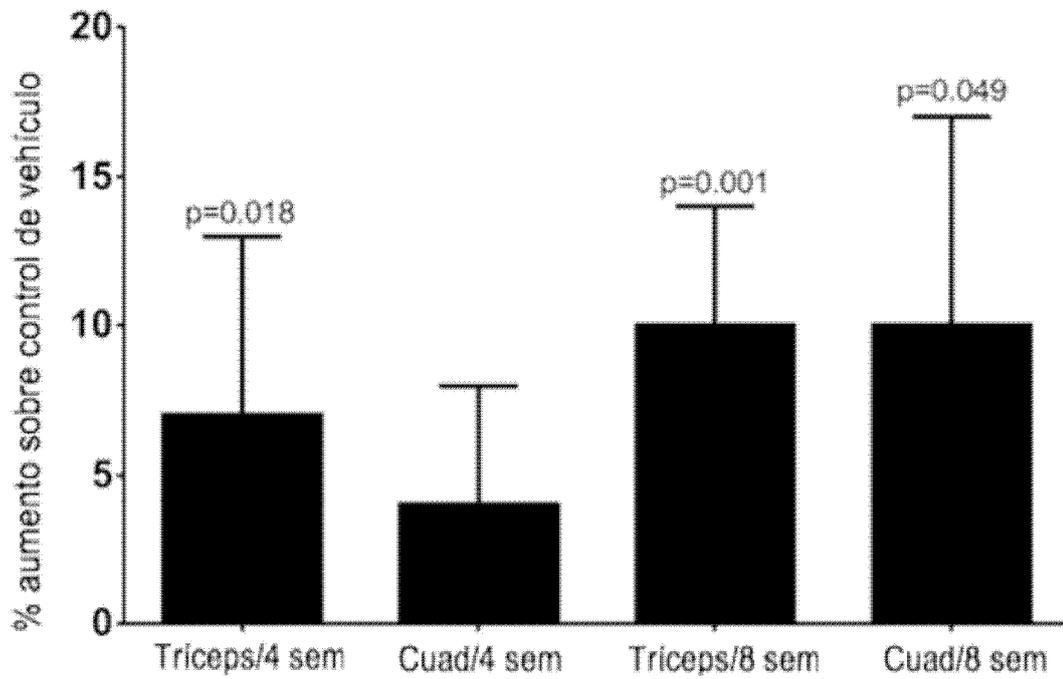


FIG. 18

Cambio porcentual sobre el control de vehículo de los diámetros de miofibra de tríceps y cuádriceps en ratones C57 tratados con FS315-mFc durante las semanas 4 y 8. Los valores P se obtuvieron de la prueba t no emparejada.

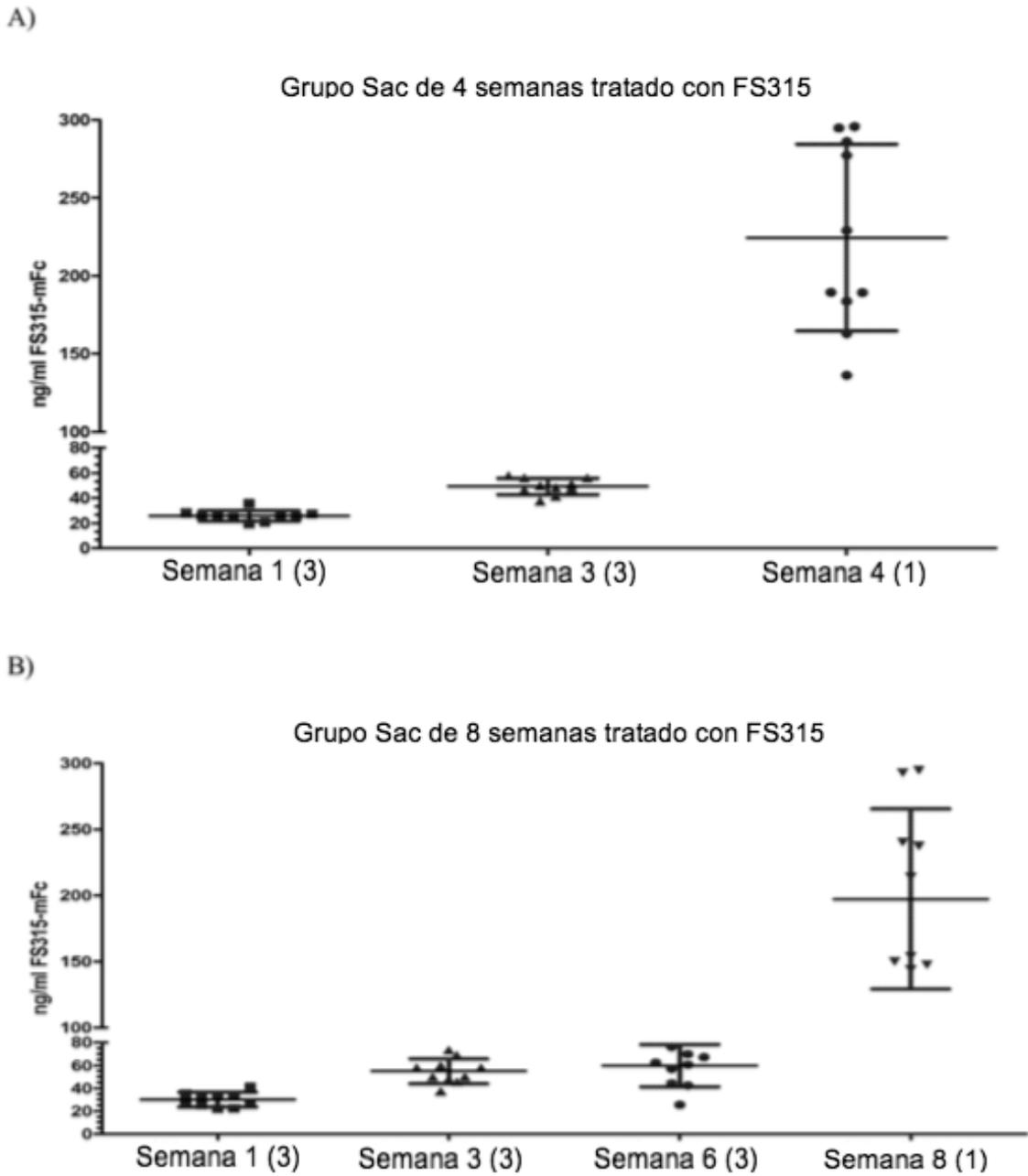


FIG.19

Niveles de FS315-mFc en suero después de la inyección subcutánea dos veces a la semana de 10 mg/kg en ratones C57. En el eje X, "Semana" se refiere a la semana del tratamiento. El número de días después de la inyección de FS315-mFc, correspondiente a cuándo se recogió el suero, se incluye en paréntesis. Los ratones tratados con el vehículo no tenían folistatina detectable en el suero.

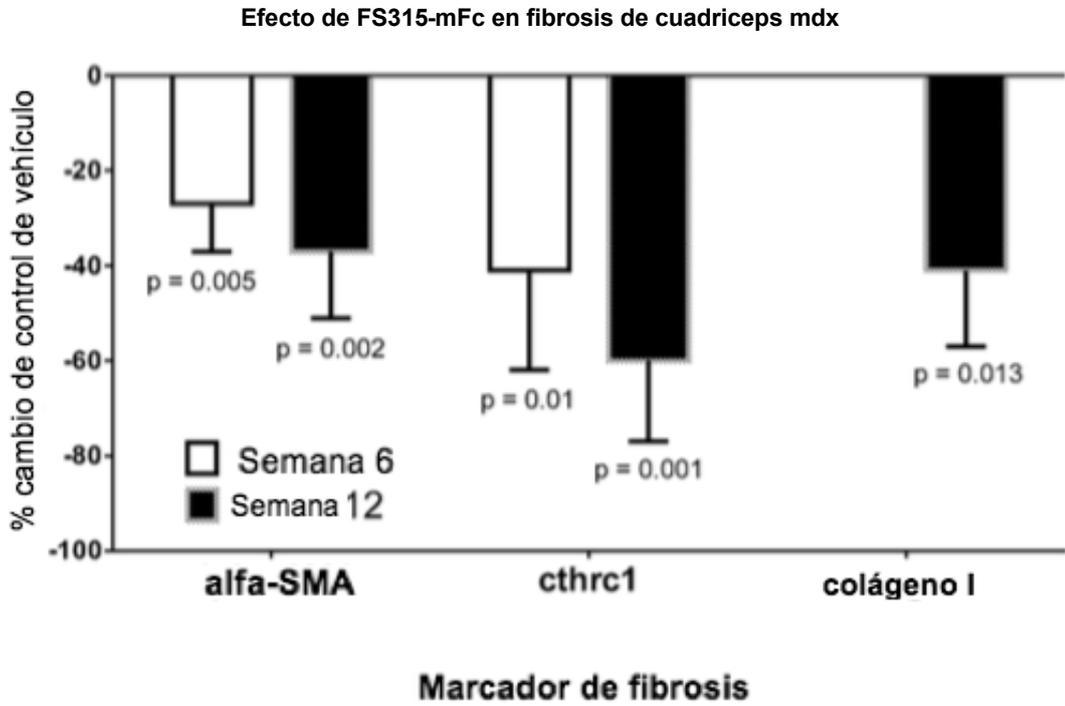


FIG. 20

Niveles de ARNm de marcadores claves de fibrosis después de 6 y 12 semanas de tratamiento de FS315-mFc de ratones mdx. RT-PCR se utilizó para cuantificar niveles de ARNm de cada proteína en cuadriceps de ratones tratados (n = 15 animales por punto de tiempo). Los valores P se obtuvieron de un ANOVA unidireccional tras la prueba comparativa por pares posthoc de Tukey o su análogo no paramétrico.

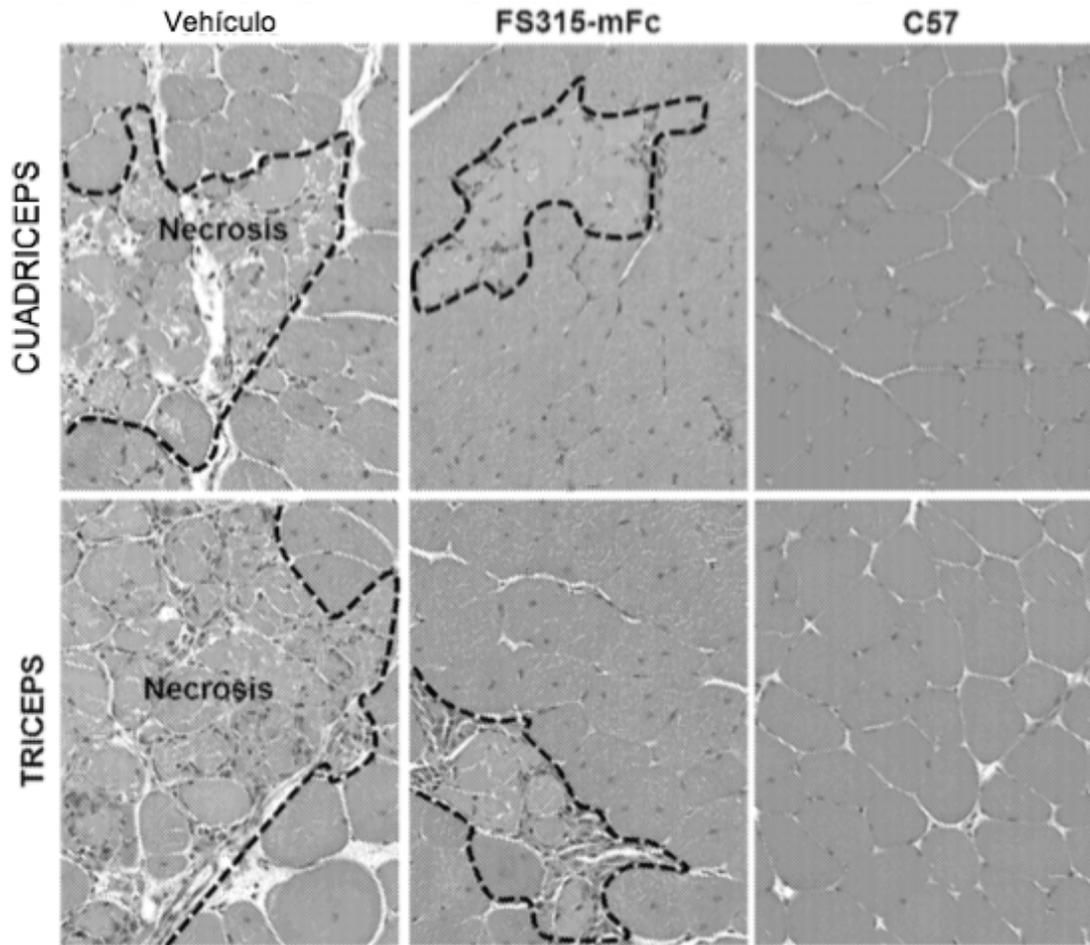


FIG. 21

Secciones teñidas H&E de músculo cuádriceps y tríceps después de 6 semanas de tratamiento dos veces a la semana con 10 mg/kg de FS315-mFc. Las áreas resaltadas indican tejido necrótico. El panel C57 representa músculo sano no afectado.

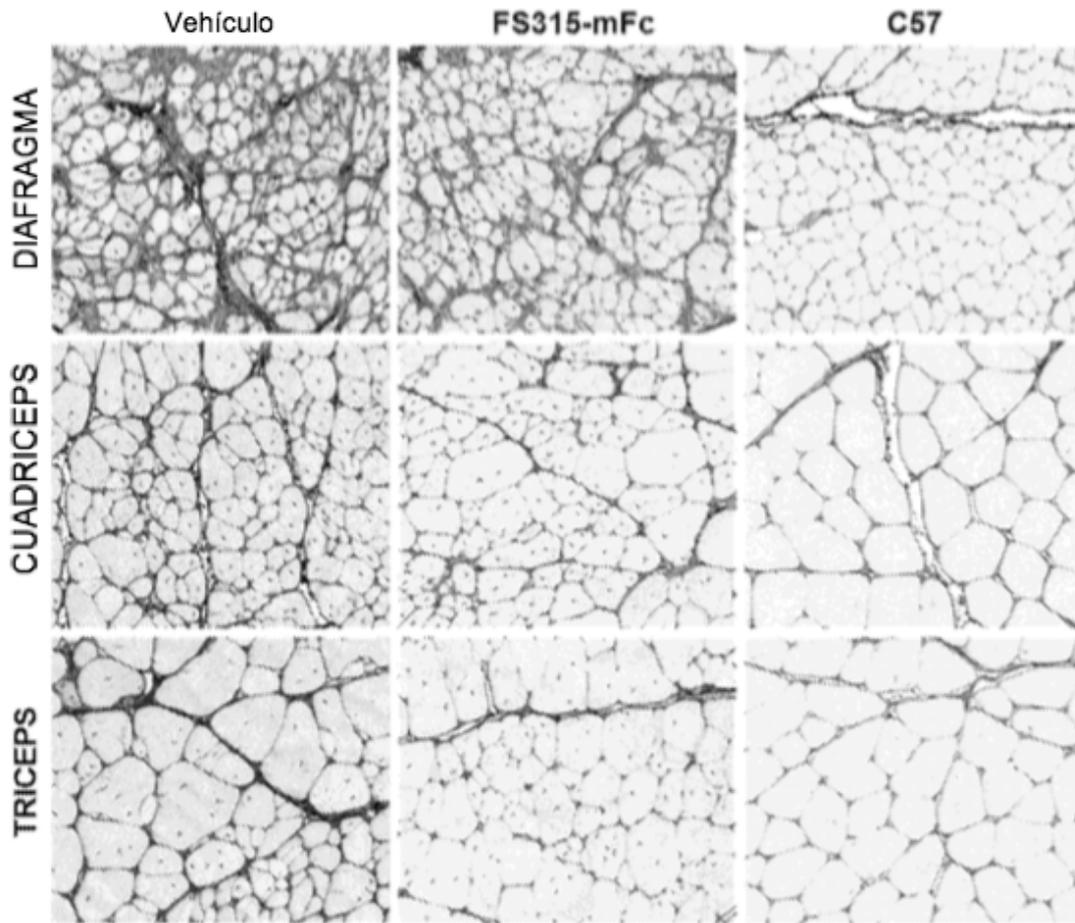


FIG. 22

Secciones teñidas con colágeno I de músculo de diafragma, cuádriceps y tríceps después de 12 semanas de tratamiento dos veces a la semana con 10 mg/kg FS315-mFc. Las áreas teñidas marrones indican deposición de colágeno I y fibrosis. El panel C57 representa el músculo sano no afectado.

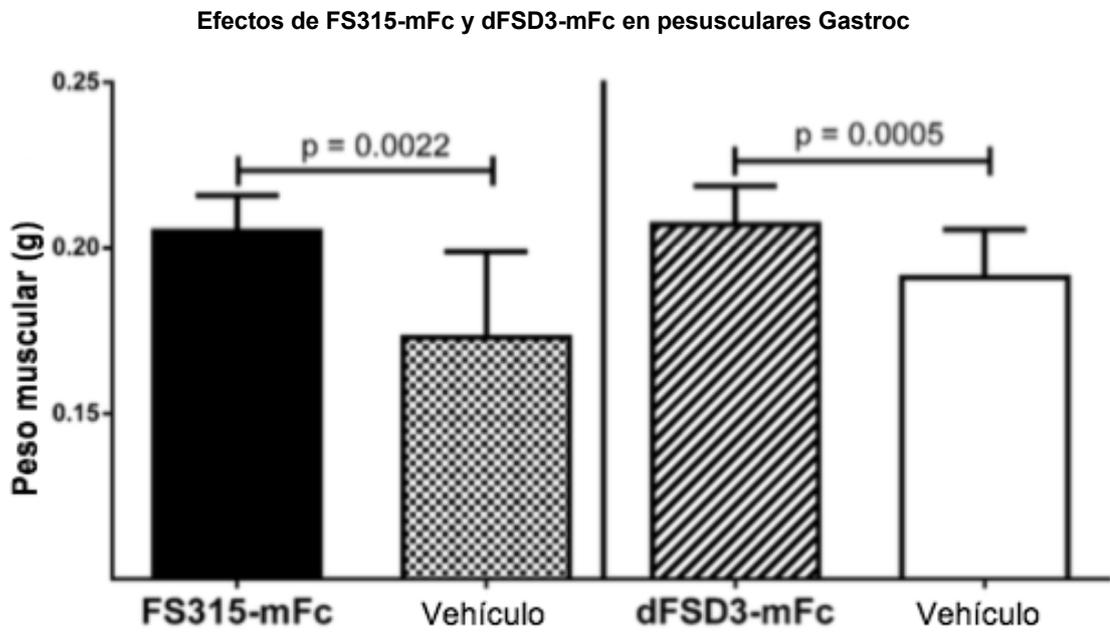


FIG. 23

El efecto farmacodinámico de FS315-mFc y dFSD3-mFc en pesos musculares inyectados después de inyecciones dos veces a la semana de 20 µg directamente en el gastrocnemio durante 4 semanas. Los valores P se obtuvieron de la prueba t emparejada (tratado con falistatina en comparación al control de vehículo).

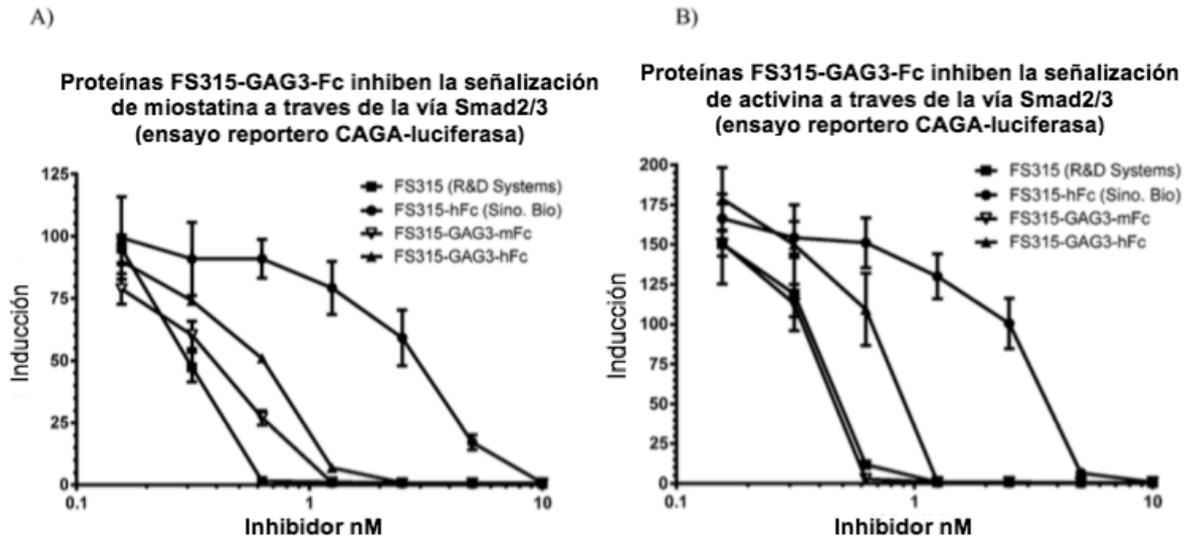


FIG. 24

FS315-GAG3-mFc y -hFc inhiben señalización de A) miostatina y B) activina a través de la vía Smad2/3 (ensayo reportero CAGA-luciferasa) en mayor medida en comparación con la proteína FS315-(9 enlazador)-hFc (Sino Biological).

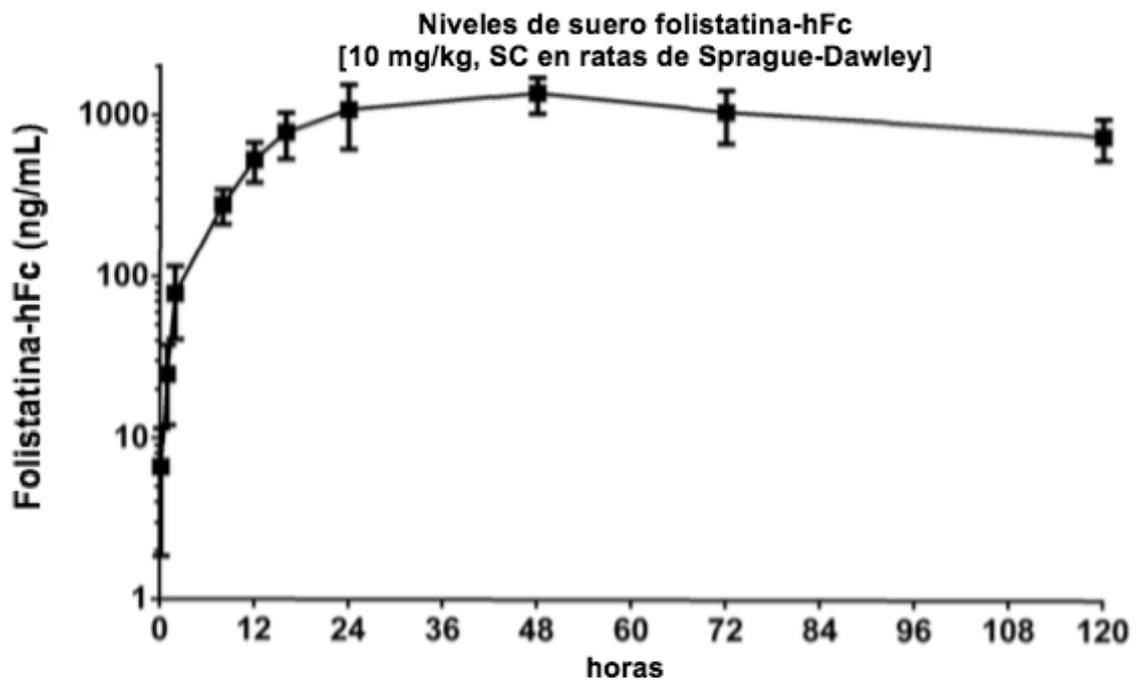


FIG. 25

Perfil PK de FS315-hFc en el suero de rata después de la inyección SC de 10 mg/kg. Vida media de suero estimada ~ 3,5 días.