

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 347**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2008** E 17185627 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** EP 3293198

54 Título: **Variantes derivadas de ActRIIB y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**02.02.2007 US 899304 P**  
**01.05.2007 US 927088 P**  
**25.05.2007 US 931880 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KNOPF, JOHN;**  
**KUMAR, RAVINDRA y**  
**SEEHRA, JASBIR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 796 347 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Variantes derivadas de ActRIIB y usos de los mismos

## 5 Antecedentes de la invención

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Al manipular la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas bovinas piemontesas y belgas azules llevan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que causa un marcado aumento en la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4. Además, en humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con un aumento de la masa muscular y, según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

Pueden lograrse cambios en los músculos, huesos, cartílagos y otros tejidos mediante señalización agonizante o antagonizante que está mediada por un miembro apropiado de la familia de TGF-beta. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes que funcionen como potentes reguladores de la señalización de TGF-beta.

## 25 Resumen de la invención

El alcance para el cual se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

A este respecto, la invención proporciona una proteína ActRIIB variante para su uso en el tratamiento de la caquexia, en donde la proteína ActRIIB variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, en donde la proteína comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína comprende un R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína comprende una D o una E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 22-25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en un aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 131, 133, o 134 de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 25 de SEQ ID NO: 2 y termina en el aminoácido 131 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína es un homodímero.

En una realización, la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga.

En una realización, la porción heteróloga comprende una región constante de una cadena pesada de IgG.

En una realización, la porción heteróloga comprende un dominio Fc.

En una realización, la proteína de fusión comprende además un dominio enlazante colocado entre el polipéptido ActRIIB y el dominio Fe.

En una realización, la proteína incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y un aminoácido conjugado a una unidad estructural lipídica.

En una realización, la proteína comprende además una secuencia de purificación seleccionada de: una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST.

En una realización, la variante de proteína ActRIIB inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células.

5 En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona polipéptidos ActRIIB, particularmente variantes de ActRIIB, que incluyen truncamientos amino y carboxi-terminales y alteraciones de secuencia. Dichos polipéptidos ActRIIB pueden usarse para el tratamiento de una variedad de trastornos o afecciones, en particular, trastornos musculares y neuromusculares (por ejemplo, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular), trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad), trastornos metabólicos (por ejemplo, diabetes tipo 2), trastornos neurodegenerativos y desgaste muscular asociados con la vejez (sarcopenia), terapia contra el cáncer de próstata y caquexia por cáncer. Los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB solubles) pueden antagonizar un receptor ActRIIB en cualquier proceso asociado con la actividad ActRIIB. Opcionalmente, los polipéptidos ActRIIB pueden diseñarse para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores ActRIIB, como GDF8 (también llamado miostatina), GDF11, activina A, activina B, activina AB, Nodal y BMP7 (también llamado OP-1), y por lo tanto puede ser útil en el tratamiento de trastornos adicionales. Ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen los polipéptidos ActRIIB naturales, así como sus variantes funcionales. La divulgación también proporciona un conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que han disminuido en gran medida la afinidad por la activina mientras retienen la unión a GDF11. Estas variantes exhiben efectos deseables sobre el músculo mientras reducen los efectos sobre otros tejidos.

20 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido ActRIIB soluble que se une a un ligando ActRIIB tal como GDF8, GDF11, activina, BMP7 o nodal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIB soluble se une a un ligando ActRIIB con un  $K_d$  inferior a 10 micromolar o inferior a 1 micromolar, 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIB soluble inhibe la señalización de ActRIIB, como los eventos de transducción de señal intracelular activados por un ligando de ActRIIB. Un polipéptido ActRIIB soluble para su uso en dicha preparación puede ser cualquiera de los descritos en este documento, como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 y 12, o que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6 y 12. Un polipéptido ActRIIB soluble puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6 y 12 o una secuencia de SEQ ID NO: 1, carece de los aminoácidos C-terminal 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 y carece de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo N-terminal. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento en relación con la SEQ ID NO: 1 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N y no más de 3 aminoácidos en el extremo C. Otro polipéptido preferido es el presentado como SEQ ID NO: 12. Un polipéptido ActRIIB soluble puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) en relación con un polipéptido ActRIIB natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIB natural. Un polipéptido ActRIIB soluble puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB o una variante del mismo) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, como la mejora farmacocinética, purificación más fácil, focalización en tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar uno o más de la estabilidad in vivo, la vida media in vivo, la absorción/administración, la localización o distribución de tejidos, la formación de complejos de proteínas, la multimerización de la proteína de fusión y/o la purificación. Una proteína de fusión de ActRIIB soluble puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina sérica. Una fusión ActRIIB-Fc puede comprender un enlazante relativamente desestructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio extracelular ActRIIB. Este enlazante no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria. Un enlazante puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, repeticiones TG<sub>4</sub> o SG<sub>4</sub>). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, como una etiqueta de epitopo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB soluble incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado con una unidad estructural lipídica y un aminoácido conjugado con un agente de derivación orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una proteína ActRIIB se exprese en una línea celular de mamífero que media la glucosilación natural adecuada de la proteína ActRIIB para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente. Las líneas celulares humanas y CHO se han usado con éxito, y se espera que sean útiles otros vectores de expresión de mamíferos comunes.

65 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona productos farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en este documento y etiquetada para su uso en la promoción del crecimiento de un tejido o la disminución o prevención de la pérdida de un tejido en un ser humano. Los tejidos de ejemplo incluyen hueso, cartílago, músculo, grasa y tejido neuronal.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos ActRIIB solubles que comprenden un dominio alterado de unión a ligando (por ejemplo, unión a GDF8). Dichos dominios alterados de unión a ligando de un receptor ActRIIB comprenden una o más mutaciones en residuos de aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano. (La numeración es relativa a la SEQ ID NO: 2). Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8/GDF11 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo salvaje de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones se demuestran aquí para aumentar la selectividad del dominio alterado de unión a ligando para GDF11 (y, por lo tanto, presumiblemente, GDF8) sobre activina (presentada con respecto a ActRIIB): K74Y, K74F, K74I y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto inverso, aumentando la proporción de unión a activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) se puede aumentar mediante la inclusión de la región de "cola" o, presumiblemente, una región de enlace no estructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que causaron una disminución general en la afinidad de unión al ligando, incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se pueden combinar para lograr los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan la proporción de GDF11:unión a activina tienen un efecto negativo general sobre la unión al ligando y, por lo tanto, pueden combinarse con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando

Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando tiene una relación de  $K_d$  para la unión de activina con respecto a  $K_d$  para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en con respecto a la relación para el dominio de unión al ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando tiene una relación de  $IC_{50}$  para inhibir activina a  $IC_{50}$  para inhibir GDF8/GDF11 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor con respecto al dominio de unión a ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando inhibe GDF8/GDF11 con un  $IC_{50}$  al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menos que el  $IC_{50}$  para inhibir la activina. Estos polipéptidos solubles de ActRIIB pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante). En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB solubles sujetos son antagonistas (inhibidores) de GDF8/GDF11.

Se contemplan otras variantes de ActRIIB, como las siguientes. Una proteína de fusión de ActRIIB variante que comprende una porción derivada de la secuencia de ActRIIB de SEQ ID NO: 2 y una segunda porción de polipéptido, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 2 (comenzando opcionalmente en 22-25 de SEQ ID NO: 2) y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 2, y en donde la proteína de fusión ActRIIB inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 2 (opcionalmente comienza en 22-25 de SEQ ID NO: 2) y termina en cualquier de aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 2 (opcionalmente comienza en 22-25 de SEQ ID NO: 2) y termina en cualquier de aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO: 4. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO: 2. La variante de proteína de fusión ActRIIB anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 2 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 2. Sorprendentemente, los constructos que comienzan en 22-25 de SEQ ID NO: 2 tienen niveles de actividad mayores que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. Cualquiera de las variantes de proteína de fusión ActRIIB anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión ActRIIB anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, como un dominio Fc.

Se contemplan otras proteínas variantes de ActRIIB, como las siguientes. Una proteína ActRIIB variante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, en donde la posición correspondiente a 64 de la SEQ ID NO: 2 es una R o K, y en donde la variante de proteína ActRIIB inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 2 se coloca fuera del bolsillo de unión al ligando. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 2 es una alteración conservadora colocada dentro del bolsillo de unión al ligando. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 2 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de una secuencia endógena N-X-S/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando.

Se contemplan otras proteínas ActRIIB variantes, como las siguientes. Una proteína ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 2, y en donde la proteína comprende al menos una secuencia NXS/T en una posición distinta de una secuencia endógena NXS/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde la proteína comprende un N en la posición correspondiente a la posición 24 de SEQ ID NO: 2 y una S o T en la posición correspondiente a la posición 26 de SEQ ID NO: 2, y en donde la proteína variante ActRIIB inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde la proteína comprende un R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 2. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 2 es una alteración conservadora colocada dentro del bolsillo de unión al ligando. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 2 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La variante de proteína ActRIIB anterior, en donde la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga. Cualquiera de las variantes de proteína de fusión ActRIIB anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión ActRIIB anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, como un dominio Fc.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIB soluble, que no codifica un polipéptido ActRIIB completo. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido ActRIIB soluble, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un ActRIIB y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRIIB, pero para un codón de parada posicionado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótidos de ActRIIB de longitud completa tal como SEQ ID NO: 4, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del término 3' o colocado de otra manera tal que la traducción del polinucleótido da lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden estar operativamente unidos a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos para fabricar un polipéptido ActRIIB soluble. Tal método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) descritos aquí en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Tal método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIB soluble, en donde dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActRIIB soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRIIB soluble así expresado. Los polipéptidos de ActRIIB solubles pueden recuperarse como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas utilizando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteínas de cultivos celulares.

En ciertos aspectos, un polipéptido ActRIIB soluble descrito en este documento puede usarse en un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado con pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente. Dichos trastornos incluyen atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y un trastorno de desgaste muscular (por ejemplo, caquexia, anorexia, síndrome DMD, síndrome BMD, síndrome de desgaste por SIDA, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares, enfermedades de las neuronas motoras, enfermedades de la unión neuromuscular y las miopatías inflamatorias). Un método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un polipéptido ActRIIB soluble.

En ciertos aspectos, un polipéptido ActRIIB soluble descrito en este documento puede usarse en un método para disminuir el contenido de grasa corporal o reducir la tasa de aumento en el contenido de grasa corporal, y para tratar un trastorno asociado con un aumento de peso corporal indeseable, tal como obesidad, diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), enfermedad cardiovascular, cáncer, hipertensión, osteoartritis, accidente

cerebrovascular, problemas respiratorios y enfermedad de la vesícula biliar. Estos métodos pueden comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un polipéptido ActRIIB soluble.

5 En ciertos aspectos específicos, un polipéptido ActRIIB soluble descrito en este documento puede usarse en un método para tratar un trastorno asociado con actividad anormal de GDF8. Tales trastornos incluyen trastornos metabólicos tales como diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por un trauma (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia de órganos; fragilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular; osteoporosis; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; fracturas relacionadas con osteoporosis; baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. El método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido ActRIIB soluble.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para identificar un agente que estimula el crecimiento de un tejido tal como hueso, cartilago, músculo y grasa. El método comprende: a) identificar un agente de prueba que se une a un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActRIIB de forma competitiva con un polipéptido ActRIIB soluble; y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento del tejido.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos para antagonizar la actividad de un polipéptido ActRIIB o un ligando ActRIIB (por ejemplo, GDF8, GDF11, activina, BMP7 y Nodal) en una célula. Los métodos comprenden poner en contacto la célula con un polipéptido ActRIIB soluble. Opcionalmente, la actividad del polipéptido ActRIIB o el ligando ActRIIB se controla mediante una transducción de señalización mediada por el complejo de ligando ActRIIB/ActRIIB, por ejemplo, monitorizando la proliferación celular. Las células de los métodos incluyen un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adipocito y una célula muscular.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona usos de un polipéptido ActRIIB soluble para hacer un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2 muestra la secuencia de proteína precursora de ActRIIB humana (SEQ ID NO: 2). El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en negrita (también denominado SEQ ID NO: 1); y los sitios potenciales de glicosilación unidos a N están encuadrados.

La Figura 3 muestra una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido soluble (extracelular) ActRIIB humano, diseñado como SEQ ID NO: 3.

La Figura 4 muestra una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína precursora de ActRIIB humana, diseñada como SEQ ID NO: 4.

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

La Figura 6 muestra los pesos de los músculos disecados al final del estudio. Vehículo: columna izquierda (sombreado claro) de cada grupo; ActRIIB (R64 20-134)-mFc: columna central (sombreado medio) de cada grupo; ActRIIB (R64 A24N 20-134): columna derecha (sombreado oscuro) de cada grupo.

La Figura 7 muestra las medidas de fuerza de agarre para PBS y ratones SOD tratados con ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc (o "K74A+15 cola") (barras blancas y negras, respectivamente). La figura ilustra el aumento de la fuerza del grupo murino ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc en comparación con el grupo PBS durante las etapas temprana (día 117) y posterior (día 149) de la enfermedad. \* P<0.05, prueba t de Student de dos colas.

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

La Figura 9 muestra el porcentaje de cambio en la composición corporal en ratones PBS y ActRIIB (R64 20-134)-mFc alimentados con HFD (barras blancas y negras, respectivamente). El tratamiento con proteína murina ActRIIB (R64 20-134)-Fc reduce significativamente la masa grasa y aumenta el tejido magro.

La Figura 10 muestra secciones transversales musculares del músculo femoral (aumento 4x) de ratones viejos (A) o ratones viejos tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc (B).

La Figura 11 muestra los pesos corporales medios para ratones en un experimento de caquexia por cáncer usando células de cáncer de colon CT26. Diamantes: animales sin tratar, tratados con solución salina; cuadrados: sin tratar, ratones tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc; triángulos: animales tumorizados, tratados con solución salina; "x": ratones tumorizados tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg); "x": ratones tumorizados tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc (30 mg/kg); círculo: ratones tumorizados tratados con ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg), tratamiento iniciado en el momento del implante tumoral para una modalidad preventiva.

La Figura 12 muestra una alineación de ActRIIA y ActRIIB humanos con los residuos que se deducen aquí, con base en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para poner en contacto directamente el ligando (el bolsillo de unión del ligando) indicado con recuadros.

La Figura 13 muestra una alineación de secuencia múltiple de diversas proteínas de ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humana.

Descripción detallada

## 1. Información general

En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a polipéptidos ActRIIB. Como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIB (ActRIIB) y proteínas relacionadas con ActRIIB, derivadas de cualquier especie. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad de serina/treonina quinasa predicha. Las secuencias de aminoácidos de la proteína precursora de ActRIIA humana (proporcionada para comparación) y la proteína precursora de ActRIIB se ilustran en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) y en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

El término "polipéptido ActRIIB" se usa para referirse a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o mayor identidad.

La presente divulgación también se refiere a polipéptidos ActRIIB solubles. Como se describe aquí, el término "polipéptido ActRIIB soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. El término "polipéptido ActRIIB soluble", como se usa en el presente documento, incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de la misma (incluidos mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y generalmente es soluble. Ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles incluyen polipéptidos solubles ActRIIB ilustrados en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia de señalización además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, ver Ejemplo 1. La secuencia de señalización puede ser una secuencia de señalización nativa de un ActRIIB, o una secuencia de señalización de otra proteína, tal como una secuencia de señalización del activador de plasminógeno tisular (TPA) o una secuencia de señalización de melatina de abeja (HBM).

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

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

La presente divulgación también se refiere a antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también denominado ligando ActRIIB) con un polipéptido ActRIIB sujeto (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB soluble). Por lo tanto, las composiciones y métodos de la presente divulgación son útiles para tratar trastornos asociados con la actividad anormal de uno o más ligandos de receptores ActRIIB. Los ligandos de ejemplo de los receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia TGF- $\beta$ , como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7.

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

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

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

El factor de crecimiento y diferenciación-11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en la yema de la cola, la yema de la extremidad, los arcos maxilar y mandibular y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 juega un papel único en el diseño de tejidos tanto mesodérmicos como neurales (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208: 222-32). Se demostró que GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo las extremidades de pollo (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229: 407-20). La expresión de GDF11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de manera similar al GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades relacionadas con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se descubrió que GDF11 inhibía la neurogénesis en

el epitelio olfativo (Wu et al., 2003, *Neuron*. 37: 197-207). Por lo tanto, GDF11 puede tener aplicaciones in vitro e in vivo en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

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

15 La presente divulgación también se refiere al uso de ciertos polipéptidos de ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles) para antagonizar la señalización de ligandos de ActRIIB en general, en cualquier proceso asociado con la actividad de ActRIIB. Opcionalmente, los polipéptidos ActRIIB de la divulgación pueden antagonizar uno o más ligandos de receptores ActRIIB, como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7, y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales.

20 Por lo tanto, la presente divulgación contempla el uso de polipéptidos ActRIIB en el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones que están asociadas con la actividad anormal de un ActRIIB o un ligando ActRIIB. Los ligandos ActRIIB o ActRIIB están involucrados en la regulación de muchos procesos biológicos críticos. Debido a sus funciones clave en estos procesos, pueden ser objetivos deseables para la intervención terapéutica. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) pueden usarse para tratar trastornos o afecciones humanas o animales. Ejemplos de tales trastornos o afecciones incluyen, pero no se limitan a, trastornos metabólicos tales como diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por trauma (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia de órganos; fragilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular. Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en las mujeres mayores y/o posmenopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; y fracturas relacionadas con osteoporosis. Sin embargo, otros ejemplos incluyen baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Estos trastornos y afecciones se analizan a continuación en "Usos terapéuticos de ejemplo".

40 Los términos usados en esta especificación generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se analizan a continuación o en otra parte de la especificación, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y cómo hacerlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.

45 "Alrededor de" y "aproximadamente" en general significará un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor dado o rango de valores.

50 Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas proporcionadas en este documento son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" puede inferirse cuando no se indica expresamente.

55 Los métodos de la divulgación pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, incluida la secuencia de tipo salvaje con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). El experto en la materia puede apreciar fácilmente que, en tales alineamientos, donde una mutación contiene una inserción o eliminación de residuos, la alineación de secuencia introducirá un "espacio" (típicamente representado por un guion o "A") en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

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

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

5 Sin embargo, en el uso común y en la aplicación instantánea, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.

## 10 2. Polipéptidos ActRIIB

En ciertos aspectos, la invención se refiere a polipéptidos variantes de ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles). Opcionalmente, los fragmentos, las variantes funcionales y las formas modificadas tienen actividades biológicas similares o iguales de sus polipéptidos ActRIIB de tipo salvaje correspondientes. Por ejemplo, una variante de ActRIIB de la invención puede unirse e inhibir la función de un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido ActRIIB modula el crecimiento de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo o grasa. Ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen el polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 5, 6 y 12).

20 La descripción identifica porciones funcionalmente activas y variantes de ActRIIB. Los solicitantes han comprobado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia descrita por Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15; 83(8): 2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de SEQ ID NO: 2 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. Por el contrario, la misma proteína de fusión Fc con una Arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y el GDF-11 en el rango desde nanomolar bajo hasta picomolar alto. Por lo tanto, se usa una secuencia con un R64 como la secuencia de referencia de tipo salvaje para ActRIIB humano en esta divulgación.

30 Attisano et al. (Cell. 1992 10 de enero; 68(1): 97-108) mostró que una eliminación del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor por la activina. Los datos presentados aquí muestran que una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO: 2, "ActRIIB (20-119)-Fc" ha reducido la unión a GDF-11 y activina en relación con un ActRIIB (20-134)-Fc, que incluye la región del nudo de prolina y el dominio completo de la yuxtamembrana. Sin embargo, una proteína ActRIIB (20-129)-Fc retiene una actividad similar pero algo reducida en relación con el tipo salvaje, a pesar de que la región del nudo de prolina está interrumpida. Por lo tanto, se espera que los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 35 134, 133, 132, 131, 130 y 129 estén activos, pero los constructos que se detienen en 134 o 133 pueden ser más activos. De manera similar, no se espera que las mutaciones en ninguno de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por márgenes grandes. En apoyo de esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión del ligando. Por lo tanto, una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión de ligando reducida. El aminoácido 119 está pobremente conservado y, por lo tanto, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o posterior retienen la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Cualquiera de estas formas puede ser deseable de usar, dependiendo del entorno clínico o experimental.

45 En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes retenga la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación ligada a N sin afectar sustancialmente la unión del ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión de señal y la región reticulada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29, se toleran bien. En particular, los constructos que comienzan en las posiciones 20, 21, 22, 23 y 24 retendrán actividad, y también se espera que los constructos que comiencen en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 retengan actividad. Los datos mostrados en los Ejemplos demuestran que, sorprendentemente, un constructo que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

55 En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 2, y los constructos pueden, por ejemplo, comenzar en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición correspondiente a aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición de 20-29 o 21-29 y terminan en una posición de 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición de 20-24 (o 21-24, o 22-25) y terminan en una posición de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133). También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, particularmente aquellas que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la porción correspondiente de SEQ ID NO: 4.

65 La divulgación incluye los resultados de un análisis de estructuras compuestas de ActRIIB, mostradas en la Figura 22, que demuestran que el bolsillo de unión al ligando está definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101. En estas posiciones, se espera que se toleren mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y

mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en *Xenopus* ActRIIB, y por lo tanto, los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para una proteína variante activa de ActRIIB es aquella que comprende los aminoácidos 29-109, pero opcionalmente comienza en una posición que varía de 20-24 o 22-25 y termina en una posición que varía de 129-134, y que no comprende más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 en el bolsillo de unión del ligando. Dicha proteína puede retener más del 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 4. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede tolerarse particularmente bien, incluyen los términos amino y carboxi del dominio extracelular (como se indicó anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) en realidad mejora la unión del ligando en el fondo A64, y por lo tanto se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión del ligando en el fondo R64. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el fondo A64, lo que demuestra que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio de R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por lo tanto, se puede tolerar otro residuo básico, como H, en la posición 64.

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

La divulgación demuestra que la adición de otro sitio de glicosilación unido a N(N-X-S/T) aumenta la vida media en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB (R64)-Fc. Al introducir una asparagina en la posición 24 (constructo A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una vida media más larga. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no estar glicosilada de manera eficiente con la R en la posición 64. Las secuencias NXS/T generalmente se pueden introducir en las posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definido en la Figura 12. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias NXS/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el enlazante entre la secuencia ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Dicho sitio puede introducirse con un esfuerzo mínimo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o introduciendo un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por lo tanto, alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación unido a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración de N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se predice que esté glicosilado puede alterarse a T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección que proporciona la glicosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que esté glicosilado puede alterarse a un S. Por lo tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Asimismo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. Por consiguiente, una variante de ActRIIB puede incluir una o más secuencias consenso de glicosilación ligadas a N no endógenas adicionales.

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

Las variaciones descritas se pueden combinar de diversas maneras. Además, los resultados del programa de mutagénesis descrito en este documento indican que existen posiciones de aminoácidos en ActRIIB que a menudo son beneficiosas para conservar. Estos incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo y particularmente triptófano), la posición 37 (ácido, y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por lo tanto, en cada una de las variantes descritas en el presente documento, la divulgación proporciona un marco de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que pueden ser deseables para

conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

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

Una variante funcional de los polipéptidos ActRIIB tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 3, 4 y 10. En ciertos casos, la variante funcional tiene un aminoácido secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 3, 4 y 10.

La presente divulgación contempla la realización de variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRIIB para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Los polipéptidos ActRIIB modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, eliminación o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrán un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB da como resultado un homólogo funcional puede determinarse fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIB variante para producir una respuesta en las células de manera similar al polipéptido ActRIIB de tipo salvaje, o para unirse a uno o más ligandos, como activina, GDF-11 o miostatina de forma similar al tipo salvaje.

La presente divulgación contempla la realización de mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB de manera que el polipéptido ActRIIB variante (o mutante) tenga actividades de unión a ligando alteradas (por ejemplo, afinidad de unión o unión especificidad). En ciertos casos, dichos polipéptidos variantes de ActRIIB tienen una afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos variantes de ActRIIB han alterado la especificidad de unión para sus ligandos.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos ActRIIB variantes que se unen preferentemente a GDF8/GDF11 en relación con las activinas. La divulgación establece además la conveniencia de tales polipéptidos para reducir los efectos fuera del objetivo, aunque tales variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves en las que se pueden necesitar ganancias muy grandes en la masa muscular para el efecto terapéutico y donde es aceptable cierto nivel del efecto fuera del objetivo. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, están en el bolsillo de unión al ligando y median la unión a sus ligandos, como activina y GDF8. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un dominio alterado de unión a ligando (por ejemplo, dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo salvaje de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio alterado de unión a ligando para GDF8 sobre activina. Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando tiene una relación de  $K_d$  para la unión de activina con respecto a  $K_d$  para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en con respecto a la relación para el dominio de unión al ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando tiene una proporción de  $IC_{50}$  para inhibir activina a  $IC_{50}$  para inhibir GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor con respecto al dominio de unión a ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio alterado de unión a ligando inhibe GDF8 con un  $IC_{50}$  al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menos que el  $IC_{50}$  para inhibir la activina.

Como ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB puede mutar a un residuo de aminoácido diferente de modo que el polipéptido variante ActRIIB se una preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido sin carga, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como otro ejemplo específico, el residuo hidrófobo, L79, se puede alterar a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión de activina a la vez que se retiene la unión de GDF11. Como reconocerá un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas pueden realizarse a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccion o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en el arte.

La presente divulgación contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIB para alterar la glucosilación del polipéptido. Ejemplos de sitios de glucosilación en polipéptidos ActRIIB se ilustran en la Figura 2. Dichas mutaciones se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como sitios de glucosilación unidos a O o N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptidos, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por las enzimas de glucosilación celular apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo salvaje (para sitios de glucosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera o tercera de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o eliminación de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glucosilación en la secuencia de tripéptidos modificada. Otro medio de aumentar el número de unidades estructurales de carbohidratos en un polipéptido ActRIIB es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el (los) azúcar(s) pueden unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos hidroxilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., Págs. 259-306. La eliminación de uno o más unidades estructurales de carbohidratos presentes en un polipéptido ActRIIB puede realizarse química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys 259: 52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de unidades estructurales de carbohidratos en los polipéptidos ActRIIB se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exoglucosidasas como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol 138: 350. La secuencia de un polipéptido ActRIIB puede ajustarse, según corresponda, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para su uso en humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glucosilación adecuada, como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que otras líneas celulares de expresión en mamíferos sean útiles.

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

La actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes también se puede probar en un ensayo basado en células o in vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido ActRIIB sobre la expresión de genes implicados en la producción ósea en osteoblastos o precursores. Esto puede realizarse, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas de ligando ActRIIB recombinantes (por ejemplo, BMP7), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido ActRIIB y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando ActRIIB. Del mismo modo, se puede administrar un polipéptido ActRIIB a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más propiedades óseas, como la densidad o el volumen. La tasa de curación para fracturas óseas también se puede evaluar. De manera similar, la actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes puede probarse en células musculares, adipocitos y células neuronales para cualquier efecto sobre el crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los ensayos que se describen a continuación. Tales ensayos son bien conocidos y rutinarios en la técnica. Se puede usar un gen indicador sensible a SMAD en tales líneas celulares para controlar los efectos sobre la señalización aguas abajo.

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva con respecto a un polipéptido ActRIIB natural. Dichas proteínas variantes, cuando se expresan a partir de constructos de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen vidas medias intracelulares dramáticamente diferentes que el correspondiente polipéptido ActRIIB de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que resultan en la destrucción o la inactivación de un polipéptido ActRIIB nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIB modulando la vida media de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando es parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRIIB recombinante dentro de la célula.

Los polipéptidos ActRIIB de la divulgación pueden comprender además modificaciones postraduccion además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB pueden probarse como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptidos ActRIIB. Cuando se produce un polipéptido ActRIIB en las células al escindir una forma naciente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento postraduccion también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccion y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActRIIB.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), maltosa proteína de unión (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para fines de purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con asociados de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIB. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como las "etiquetas de epitopo", que generalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epitopos bien conocidas para las cuales los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de la proteasa, como el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por lo tanto, libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse luego del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. Un polipéptido ActRIIB puede fusionarse con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumenta la vida media en suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución de la eliminación por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables para una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a la albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, como una mayor estimulación del crecimiento muscular).

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

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAKGQPR  
 EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK\*

Preferentemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fcy en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad de unión al receptor Fc relacionado con MHC de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo salvaje.

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede colocarse C-terminal a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede colocarse C-terminal a un polipéptido ActRIIB. El dominio del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan ser adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios adicionales o secuencias de aminoácidos C-o N-terminales en cualquiera de los dominios o entre los dominios.

Los polipéptidos ActRIIB de la presente divulgación pueden contener una o más modificaciones que sean capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la vida media in vitro de los polipéptidos ActRIIB, mejoran la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un ActRIIB polipéptido), y modificaciones de la unidad estructural carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de unidades estructurales carbohidrato de un polipéptido ActRIIB). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas como una unidad estructural de carbohidrato o un polímero no proteico, como el polietilenglicol.

La presente divulgación pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIB, que se aíslan de otras proteínas o, de otro modo, están sustancialmente libres de ellas.

Los polipéptidos ActRIIB (no modificados o modificados) de la divulgación pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos ActRIIB pueden sintetizarse utilizando técnicas estándar de química de proteínas como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant GA (ed.), Synthetic Peptides: A User Guide, WH Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, están disponibles comercialmente sintetizadores automáticos de péptidos (por ejemplo, Advanced ChemTech Modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, los polipéptidos ActRIIB, fragmentos o variantes de los mismos pueden producirse de manera recombinante usando diversos sistemas de expresión (por ejemplo, E. coli, células de ovario de hámster chino, células COS, baculovirus) como es bien conocido en la técnica (véase también a continuación). Los polipéptidos ActRIIB modificados o no modificados pueden producirse por digestión de polipéptidos ActRIIB de longitud completa producidos de forma natural o recombinante utilizando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima convertidora de aminoácidos básicos apareados (PACE). El análisis por ordenador (usando un software comercialmente disponible, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) puede usarse para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, dichos polipéptidos ActRIIB pueden producirse a partir de polipéptidos ActRIIB de longitud completa producidos de forma natural o recombinante, tales como técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como por escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

### 3. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos ActRIIB

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles), incluidas cualquiera de las variantes descritas en el presente documento. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 3 codifica un polipéptido de ActRIIB soluble. Los ácidos nucleicos objetivo pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos para fabricar polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en una metodología de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende que los ácidos nucleicos objetivo que codifican los polipéptidos ActRIIB incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas; y, por lo tanto, incluirá secuencias de codificación que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación designada en SEQ ID NO: 4.

La presente divulgación proporciona secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la SEQ ID NO: 3. Un experto en la materia apreciarán que las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a la SEQ ID NO: 3 y las variantes de la SEQ ID NO: 3 también están dentro del alcance de esta divulgación. Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente divulgación se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente estrictas con la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 3, la secuencia del complemento de la SEQ ID NO: 3 o fragmentos de la misma. Como se discutió anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de restricción apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de restricción apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación a 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2.0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja restricción de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C hasta una alta restricción de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta restricción a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la

temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja restricción de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

5 Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 3 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, varios aminoácidos están designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto existan entre las células de mamíferos. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas estas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta divulgación.

15 Los ácidos nucleicos recombinantes de la presente divulgación pueden estar operativamente unidos a una o más secuencias de nucleótidos reguladores en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas en la técnica para una variedad de células huésped. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladores pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación transcripcionales, secuencias de inicio y terminación de traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. La presente divulgación contempla los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, como un plásmido, o el constructo de expresión puede insertarse en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada.

30 El ácido nucleico sujeto puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y puede unirse operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIB. En consecuencia, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras de ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Dichas secuencias útiles de control de la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de la cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento  $\alpha$  de levadura, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores antibióticos.

50 Se puede producir un ácido nucleico recombinante de la presente divulgación ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero), o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, como E. coli.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden usarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluidos los retrovirales) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los

plásmidos y en la transformación de organismos hospedantes son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (como el  $\beta$ -gal que contiene pBlueBac III).

Se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIB objetivo en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, CA), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, California) y pCI-neo vectores (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, los constructos de genes en cuestión pueden usarse para causar la expresión de los polipéptidos ActRIIB en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

Esta divulgación también se refiere a una célula huésped transflectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) para uno o más del polipéptido ActRIIB sujeto. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB de la presente divulgación puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere además a métodos para producir los polipéptidos ActRIIB objetivo. Por ejemplo, una célula huésped transflectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB se puede retener citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActRIIB objetivo pueden aislarse del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación de inmunoadfinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

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

Las técnicas para hacer genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando terminales con extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. El gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recodados para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

#### 4. Anticuerpos

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a anticuerpos. Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB soluble) y que se une competitivamente con el polipéptido ActRIIB puede usarse como un antagonista de las actividades del polipéptido ActRIIB. Por ejemplo, mediante el uso de inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIB, los antisueros antiproteína/antipeptido o los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. Por Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Prensa: 1988)). Un mamífero, como un ratón, un hámster o un conejo puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido ActRIIB, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen la conjugación con portadores u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Se puede administrar una porción inmunogénica de un polipéptido ActRIIB en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede controlarse mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. El ELISA estándar u otros inmunoensayos pueden usarse con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

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

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIB sujeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos pueden seleccionarse por utilidad de la misma manera que se describe anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo de la presente divulgación pretende además incluir moléculas biespecíficas, de cadena sencilla, quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido ActRIIB conferido por al menos una región CDR del anticuerpo. El anticuerpo puede comprender además un marcador unido al mismo y capaz de ser detectado (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor enzimático).

Un anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo monoclonal, y en ciertos casos, la presente divulgación pone a disposición métodos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActRIIB puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido ActRIIB eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obteniendo células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) del ratón y fusionando las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y probando los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRIIB. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRIIB. El anticuerpo monoclonal puede purificarse del cultivo celular.

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

Además, las técnicas utilizadas para seleccionar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unir un antígeno en solución, puede ser deseable probar la unión a la solución. Una variedad de técnicas diferentes está disponible para probar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, el ensayo de unión de Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suecia), ensayos tipo sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunoprecipitación Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen a un polipéptido ActRIIB soluble. Dichos anticuerpos pueden generarse como se describe anteriormente, usando un polipéptido ActRIIB soluble o un fragmento del mismo como antígeno. Los anticuerpos de este tipo pueden usarse, por ejemplo, para detectar polipéptidos ActRIIB en muestras biológicas y/o para controlar los niveles de polipéptidos ActRIIB solubles en un individuo. En ciertos casos, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido ActRIIB soluble puede usarse para modular la actividad de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB, regulando así (promoviendo o inhibiendo) el crecimiento de tejidos, como hueso, cartilago, músculo, grasa y neuronas.

5. Ensayos de detección

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

Existen numerosos enfoques para el cribado de agentes terapéuticos para modular el crecimiento de tejidos dirigidos a los polipéptidos ActRIIB. Se puede realizar un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturben los efectos mediados por ActRIIB sobre el crecimiento de hueso, cartílago, músculo, grasa y/o neuronas. El ensayo se puede llevar a cabo para detectar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su compañero de unión, como un ligando ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIB a su proteína de unión tal como un ligando ActRIIB. Los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente divulgación, los que no se describen expresamente aquí serán comprendidos por un experto en la materia. Como se describe en el presente documento, los compuestos de prueba (agentes) de la presente divulgación pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos sujetos pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) que se analizarán para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento de los tejidos pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos peptidomiméticos), o producido de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados por la presente divulgación incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de prueba puede ser una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 daltons.

Los compuestos de prueba de la presente divulgación pueden proporcionarse como entidades individuales, discretas, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tal como las realizadas por la química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en los pasos iniciales de selección. Opcionalmente, los compuestos pueden someterse a derivación opcionalmente con otros compuestos y tener grupos de derivación que faciliten el aislamiento de los compuestos. Ejemplos no limitantes de grupos de derivación incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticuladores fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos estudiados en un periodo de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, como los que pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como pantallas "primarias", ya que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en un blanco molecular que está mediado por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de prueba generalmente se pueden ignorar en el sistema in vitro, y el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco en el objetivo molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión (por ejemplo, un ligando ActRIIB).

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado ejemplar de la presente divulgación, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. Luego, a la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB se agrega una composición que contiene un ligando ActRIIB. La detección y cuantificación de los complejos de ligando ActRIIB/ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se agrega ligando ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y la formación del complejo de ligando ActRIIB/ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en que se pueden mezclar los reactivos se puede variar, y se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden usarse extractos celulares y lisados para proporcionar un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación compleja entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, como las radiomarcadas (por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ ), marcadas

fluorescentemente (por ejemplo, FITC) o el polipéptido ActRIIB marcado enzimáticamente o su proteína de unión, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

La presente divulgación contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, como los basados en guías de ondas ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de los Estados Unidos No. 5,677,196), resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchos métodos de la presente divulgación.

Además, la presente divulgación contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72: 223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; y Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696). La presente divulgación contempla el uso de dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27: 919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17: 374-81; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

Los compuestos en cuestión pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB de la presente divulgación. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de proteína utilizando métodos bioquímicos *in vitro*, que incluyen fotorreticulación, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden seleccionarse en un ensayo basado en un mecanismo, como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB puede transfectarse con un sistema informador (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y seleccionarse contra la biblioteca preferiblemente mediante un examen de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con el objetivo fijado a un pozo, perla o chip o capturado por un anticuerpo inmovilizado o resuelto por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse usualmente usando resonancia colorimétrica o fluorescente o de plasmón superficial.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos y agentes para estimular el crecimiento muscular y aumentar la masa muscular, por ejemplo, antagonizando las funciones de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede analizarse en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento muscular. Se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica para este propósito. Por ejemplo, los métodos de la presente divulgación se realizan de tal manera que la transducción de señales a través de una proteína ActRIIB activada mediante la unión a un ligando ActRIIB (por ejemplo, GDF8) se ha reducido o inhibido. Se reconocerá que el crecimiento del tejido muscular en el organismo daría lugar a un aumento de la masa muscular en el organismo en comparación con la masa muscular de un organismo correspondiente (o población de organismos) en el que la transducción de señales a través de una proteína ActRIIB no había sido tan afectado.

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

La presente divulgación también contempla ensayos *in vivo* para medir la masa muscular y la fuerza. Por ejemplo, Whittemore et al. (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300: 965-71) divulga un método para medir el aumento de la masa del músculo esquelético y la mayor fuerza de agarre en ratones. Opcionalmente, este método puede usarse para determinar los efectos terapéuticos de los compuestos de prueba (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) sobre enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo, aquellas enfermedades para las cuales la masa muscular es limitante.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación ósea y aumentar la masa ósea. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede analizarse en células o tejidos enteros, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento óseo o cartilaginoso. Se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica para este propósito.

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

La presente divulgación también contempla ensayos in vivo para medir el crecimiento de hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., *Bone*, 28: 80-86 (2001) divulga un modelo osteoporótico de rata en el que se estudia la reparación ósea durante el período inicial después de la fractura. Kubo et al., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68: 197-202 (1999) también divulga un modelo osteoporótico de rata en el que se estudia la reparación ósea durante el último período después de la fractura. Estas referencias se citan en el presente documento por su divulgación del modelo de rata para el estudio sobre fractura ósea osteoporótica. En ciertos aspectos, la presente divulgación hace uso de ensayos de curación de fracturas que son conocidos en la técnica. Estos ensayos incluyen técnica de fractura, análisis histológico y análisis biomecánico, que se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6,521,750, que se cita por su divulgación de protocolos experimentales para causar y medir el alcance de las fracturas y el proceso de reparación.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos y agentes para controlar el aumento de peso y la obesidad. A nivel celular, la proliferación y diferenciación de adipocitos es crítica en el desarrollo de la obesidad, lo que conduce a la generación de células adiposas adicionales (adipocitos). Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede analizarse en células o tejidos completos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad de modular la adipogénesis midiendo la proliferación o diferenciación de adipocitos. Se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica para este propósito. Por ejemplo, el efecto de un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB soluble) o compuestos de prueba sobre la adipogénesis puede determinarse midiendo la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros en ensayos basados en células, tales como, observando la acumulación de triacilglicerol en vesículas de tinción con aceite rojo O y por la aparición de ciertos marcadores de adipocitos como FABP (aP2/422) y PPAPy2. Véase, por ejemplo, Reusch et al., 2000, *Mol Cell Biol.* 20: 1008-20; Deng et al., 2000, *Endocrinology.* 141: 2370-6; Bell et al., 2000, *Obes Res.* 8: 249-54. Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye el análisis del papel de los polipéptidos ActRIIB y los compuestos de prueba en la proliferación de adipocitos o células precursoras de adipocitos (por ejemplo, células 3T3-L1), tales como, mediante el monitoreo de células positivas para bromodeoxiuridina (BrdU). Véase, por ejemplo, Pico et al., 1998, *Mol Cell Biochem.* 189: 1-7; Masuno et al., 2003, *Toxicol Sci.* 75: 314-20.

Se entiende que los ensayos de cribado de la presente divulgación se aplican no solo a los polipéptidos ActRIIB objeto y las variantes de los polipéptidos ActRIIB, sino también a cualquier compuesto de prueba que incluya agonistas y antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Además, estos ensayos de detección son útiles para fines de verificación de dianas de fármacos y control de calidad.

#### 6. Usos terapéuticos de ejemplo

Las composiciones (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) de la presente divulgación pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección que está asociada con la actividad anormal de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB (por ejemplo, GDF8). Estas enfermedades, trastornos o afecciones generalmente se denominan en el presente documento "afecciones asociadas a ActRIIB". Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir a un individuo que lo necesita mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido ActRIIB como se describió anteriormente. Estos métodos están especialmente dirigidos a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales y, más particularmente, de humanos.

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

Los complejos de ligando ActRIIB/ActRIIB juegan papeles esenciales en el crecimiento de tejidos, así como en procesos de desarrollo tempranos tales como la formación correcta de diversas estructuras o en una o más capacidades postdesarrollo que incluyen desarrollo sexual, producción de hormonas hipofisarias y creación de hueso y cartílago. Por lo tanto, las afecciones asociadas a ActRIIB incluyen crecimiento anormal de tejido y defectos de desarrollo. Además, las afecciones asociadas a ActRIIB incluyen, pero no se limitan a, trastornos del crecimiento y diferenciación celular tales como inflamación, alergia, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y tumores.

Afecciones de ejemplo asociadas con ActRIIB incluyen trastornos neuromusculares (por ejemplo, distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y desgaste muscular asociado con EPOC), síndrome de desgaste muscular, sarcopenia, caquexia, trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad), diabetes tipo 2 y enfermedad degenerativa ósea (por ejemplo, osteoporosis). Otras afecciones de ejemplo asociadas a ActRIIB incluyen trastornos musculodegenerativos y neuromusculares, reparación de tejidos (por ejemplo, cicatrización de heridas), enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica), trastornos inmunológicos (por ejemplo, trastornos relacionados con la proliferación o función anormal de linfocitos) y obesidad o trastornos relacionados con la proliferación anormal de adipocitos.

Las composiciones (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) de la presente divulgación pueden usarse como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. El término "distrofia muscular" se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por el debilitamiento gradual y el deterioro de los músculos esqueléticos y, a veces, los músculos cardíacos y respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por desgaste muscular progresivo y debilidad que comienzan con cambios microscópicos en el músculo. A medida que los músculos se degeneran con el tiempo, la fuerza muscular de la persona disminuye. Las distrofias musculares de ejemplo que se pueden tratar con un régimen que incluye los polipéptidos ActRIIB objetivo incluyen: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), distrofia muscular de la cintura y extremidades (LGMD), Distrofia muscular facioescapular (FSH o FSHD) (también conocida como Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (MMD) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), distrofia muscular distal (DD), distrofia muscular congénita (CMD).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en la década de 1860. La distrofia muscular de Becker (DMO) lleva el nombre del médico alemán Peter Emil Becker, quien describió por primera vez esta variante de DMD en la década de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en los hombres, que afecta a uno de cada 3.500 niños. La DMD ocurre cuando el gen de la distrofina, ubicado en el brazo corto del cromosoma X, se rompe. Como los hombres solo tienen una copia del cromosoma X, solo tienen una copia del gen de la distrofina. Sin la proteína distrofina, el músculo se daña fácilmente durante los ciclos de contracción y relajación. Si bien al principio de la enfermedad, el músculo compensa la regeneración, más adelante las células progenitoras musculares no pueden mantenerse al día con el daño continuo y el músculo sano es reemplazado por tejido fibrograso no funcional.

La DMO resulta de diferentes mutaciones en el gen de la distrofina. Los pacientes con DMO tienen algo de distrofina, pero es insuficiente en cantidad o de baja calidad. Tener algo de distrofina protege los músculos de las personas con DMO de degenerar tan mal o tan rápido como los de las personas con DMD.

Por ejemplo, investigaciones recientes demuestran que el bloqueo o la eliminación de la función de GDF8 (un ligando ActRIIB) in vivo puede tratar al menos ciertos síntomas en pacientes con DMD y BMD. Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB objetivo pueden actuar como inhibidores (antagonistas) de GDF8 y constituir un medio alternativo para bloquear las funciones de GDF8 y/o ActRIIB in vivo en pacientes con DMD y BMD. Este enfoque está confirmado y respaldado por los datos que se muestran en este documento, mediante los cuales se demostró que una proteína ActRIIB-Fc aumenta la masa muscular en un modelo de distrofia muscular en ratones.

De manera similar, los polipéptidos ActRIIB objetivo proporcionan un medio eficaz para aumentar la masa muscular en otras enfermedades que necesitan crecimiento muscular. Por ejemplo, la ELA, también llamada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de las neuronas motoras), es un trastorno crónico, incurable e imparable del SNC que ataca a las neuronas motoras, componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos esqueléticos. En la ELA, las neuronas motoras se deterioran y eventualmente mueren, y aunque el cerebro de una persona normalmente permanece en pleno funcionamiento y alerta, la orden de moverse nunca llega a los músculos. La mayoría de las personas que contraen ELA tienen entre 40 y 70 años. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son las que conducen a los brazos o las piernas. Las personas con ELA pueden tener problemas para caminar, pueden dejar caer cosas, caerse, arrastrar la voz y reír o llorar sin control. Finalmente, los músculos de las extremidades comienzan a atrofiarse por el desuso. Esta debilidad muscular se volverá debilitante y una persona necesitará una silla de ruedas o no podrá funcionar fuera de la cama. La mayoría de los pacientes con ELA mueren por insuficiencia respiratoria o por complicaciones de la asistencia respiratoria, como neumonía, de 3 a 5 años desde el inicio de la enfermedad. Este enfoque está confirmado y respaldado por los datos que se muestran en este documento, mediante los cuales se demostró que una proteína ActRIIB-Fc mejora la apariencia, la masa muscular y la vida útil de un modelo de ALS en ratones.

El aumento de la masa muscular inducida por el polipéptido ActRIIB también podría beneficiar a aquellos que padecen enfermedades de desgaste muscular. Gonzalez-Cadavid et al. (supra) informaron que la expresión de GDF8 se correlaciona inversamente con la masa libre de grasa en humanos y que el aumento de la expresión del gen GDF8 está asociado con la pérdida de peso en hombres con síndrome de pérdida por SIDA. Al inhibir la función de GDF8 en pacientes con SIDA, al menos ciertos síntomas del SIDA pueden aliviarse, si no se eliminan por completo, mejorando significativamente la calidad de vida en pacientes con SIDA.

Dado que la pérdida de la función GDF8 (un ligando ActRIIB) también está asociada con la pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes (Zimmers et al., Supra; McPherron and Lee, supra), los polipéptidos ActRIIB objetivo pueden usarse adicionalmente como un agente terapéutico para retrasar o prevenir el desarrollo de obesidad y diabetes tipo II. Este enfoque está confirmado y respaldado por los datos mostrados en este documento, mediante los cuales se demostró que una proteína ActRIIB-Fc mejora el estado metabólico en ratones obesos.

El síndrome de anorexia-caquexia cancerosa se encuentra entre los aspectos más debilitantes y potencialmente mortales del cáncer. La pérdida progresiva de peso en el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer es una característica común de muchos tipos de cáncer y es responsable no solo de una mala calidad de vida y una pobre respuesta a la quimioterapia, sino también de un tiempo de supervivencia más corto que el que se encuentra en pacientes con tumores comparables sin pérdida de peso. Asociada con la anorexia, el desgaste de grasa y tejido muscular, la angustia psicológica y una menor calidad de vida, la caquexia surge de una interacción compleja entre el cáncer y el huésped. Es una de las causas más comunes de muerte entre los pacientes con cáncer y está presente en el 80% de los casos de muerte. Es un ejemplo complejo de caos metabólico que afecta el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas. Los tumores producen anomalías directas e indirectas, lo que resulta en anorexia y pérdida de peso. Actualmente, no existe un tratamiento para controlar o revertir el proceso. El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer afecta la producción de citoquinas, la liberación de factores inductores de proteólisis y movilización de lípidos, y alteraciones en el metabolismo intermedio. Aunque la anorexia es común, una disminución de la ingesta de alimentos por sí sola no puede explicar los cambios en la composición corporal observados en pacientes con cáncer, y el aumento de la ingesta de nutrientes no puede revertir el síndrome de desgaste. Debe sospecharse caquexia en pacientes con cáncer si se produce una pérdida de peso involuntaria de más del cinco por ciento del peso premórbido dentro de un período de seis meses.

Dado que se descubrió que la sobreexpresión sistémica de GDF8 en ratones adultos induce una pérdida muscular y grasa profunda análoga a la observada en los síndromes de caquexia humana (Zimmers et al., supra), los polipéptidos ActRIIB objetivo como composiciones farmacéuticas pueden usarse beneficiosamente para prevenir, tratar o aliviar los síntomas del síndrome de caquexia, donde se desea el crecimiento muscular.

La presente divulgación también proporciona métodos para inducir la formación de hueso y/o cartílago, evitando la pérdida ósea, aumentando la mineralización ósea o evitando la desmineralización del hueso. Por ejemplo, los polipéptidos y compuestos ActRIIB objetivo identificados en la presente divulgación tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y la curación de fracturas óseas y defectos del cartílago en humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRIIB pueden ser útiles en pacientes diagnosticados con baja densidad ósea subclínica, como medida de protección contra el desarrollo de osteoporosis.

Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden encontrar utilidad médica en la curación de fracturas óseas y defectos de cartílago en humanos y otros animales. Los métodos y composiciones en cuestión también pueden tener un uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas y abiertas y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de hueso de novo inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo u resección oncológica, y también es útil en cirugía plástica cosmética. Además, los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse en el tratamiento de la enfermedad periodontal, y en otros procesos de reparación dental. En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB objetivo pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Los polipéptidos ActRIIB de la presente divulgación también pueden ser útiles en el tratamiento de la osteoporosis. Además, los polipéptidos ActRIIB pueden usarse en la reparación de defectos de cartílago y la prevención/reversión de la osteoartritis.

La presente divulgación proporciona un método terapéutico y una composición para reparar fracturas y otras afecciones relacionadas con cartílago y/o defectos óseos o enfermedades periodontales. La presente divulgación proporciona además métodos terapéuticos y composiciones para la curación de heridas y reparación de tejidos. Los tipos de heridas incluyen, entre otras, quemaduras, incisiones y úlceras. Véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO84/01106. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los polipéptidos ActRIIB de la presente divulgación en mezcla con un vehículo, vehículo o matriz farmacéuticamente aceptable.

Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden aplicarse a afecciones que causan pérdida ósea tales como osteoporosis, hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, tirotoxicosis, estado diarreico crónico o malabsorción, acidosis tubular renal o anorexia nerviosa. Muchas personas saben que ser mujer, tener un peso corporal bajo y llevar un estilo de vida sedentario son factores de riesgo de osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea, lo que conlleva un riesgo de fractura). Sin embargo, la osteoporosis también puede ser el resultado del uso a largo plazo de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante de medicamentos u otra afección médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una condición conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad excesiva de cortisol producida por el cuerpo produce osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados con la osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de medicamentos que actúan como el cortisol, una hormona producida de forma natural por las glándulas suprarrenales. Aunque se necesitan niveles adecuados de

hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroides) para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormona tiroidea puede disminuir la masa ósea con el tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden conducir a la pérdida ósea cuando las personas con problemas renales las toman en altas dosis, particularmente las que se someten a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbitúricos que se usan para prevenir las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un medicamento para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un medicamento utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para suprimir el sistema inmune en pacientes con trasplante de órganos; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), utilizados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (calciparina, liquaemina), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), utilizados para tratar el colesterol alto. La enfermedad de las encías causa pérdida ósea porque estas bacterias dañinas en nuestras bocas obligan a nuestros cuerpos a defenderse de ellas. La bacteria produce toxinas y enzimas debajo de la línea de las encías, causando una infección crónica.

La presente divulgación proporciona métodos y agentes terapéuticos para tratar enfermedades o trastornos asociados con el crecimiento óseo anormal o no deseado. Por ejemplo, los pacientes con la enfermedad conocida como Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) desarrollan un "segundo esqueleto" anormal que impide cualquier movimiento. Además, puede ocurrir un crecimiento óseo anormal después de la cirugía de reemplazo de cadera y, por lo tanto, arruinar el resultado quirúrgico. Este es un ejemplo más común de crecimiento óseo patológico y una situación en donde los métodos y composiciones en cuestión pueden ser terapéuticamente útiles. Los mismos métodos y composiciones también pueden ser útiles para tratar otras formas de crecimiento óseo anormal (por ejemplo, crecimiento patológico del hueso después de un trauma, quemaduras o lesión de la médula espinal), y para tratar o prevenir las condiciones indeseables asociadas con el crecimiento óseo anormal visto en conexión con cáncer de próstata metastásico u osteosarcoma. Ejemplos de estos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, polipéptidos ActRIIB que antagonizan la función de un ligando de ActRIIB (por ejemplo, BMP7), compuestos que interrumpen la interacción entre un ActRIIB y su ligando (por ejemplo, BMP7) y anticuerpos que se unen específicamente a un receptor de ActRIIB de manera que un ligando de ActRIIB (por ejemplo, BMP7) no pueda unirse al receptor de ActRIIB.

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para regular el contenido de grasa corporal en un animal y para tratar o prevenir afecciones relacionadas con el mismo, y particularmente, condiciones que comprometen la salud relacionadas con el mismo. Según la presente divulgación, regular (controlar) el peso corporal puede referirse a reducir o aumentar el peso corporal, reducir o aumentar la tasa de aumento de peso, o aumentar o reducir la tasa de pérdida de peso, y también incluye mantener activamente, o no significativamente cambio de peso corporal (por ejemplo, contra influencias externas o internas que de otro modo podrían aumentar o disminuir el peso corporal). La presente divulgación también se refiere a la regulación del peso corporal mediante la administración a un animal (por ejemplo, un humano) que lo necesite, un polipéptido ActRIIB.

La presente divulgación también se refiere a métodos y compuestos para reducir el peso corporal y/o reducir el aumento de peso en un animal, y más particularmente, para tratar o mejorar la obesidad en pacientes con riesgo o que padecen obesidad. También se describen en el presente documento métodos y compuestos para tratar un animal que no puede aumentar o retener peso (por ejemplo, un animal con un síndrome de emaciación). Tales métodos son efectivos para aumentar el peso corporal y/o la masa, o para reducir el peso y/o la pérdida de masa, o para mejorar las condiciones asociadas o causadas por un peso y/o masa corporal indeseablemente baja (por ejemplo, poco saludable).

Otros trastornos, incluido el colesterol alto, que pueden tratarse con proteínas ActRIIB se describen en los Ejemplos.

## 7. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) de la presente divulgación pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden formularse para administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

El método terapéutico de la presente divulgación incluye administrar la composición por vía tópica, sistémica o local como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en Esta divulgación está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Además, la composición puede encapsularse o inyectarse deseablemente en una forma viscosa para administrarla a un sitio de tejido objetivo (por ejemplo, hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo, un sitio que tiene un daño en el tejido. La administración tópica puede ser adecuada para la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos ActRIIB que también se pueden incluir opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, se pueden administrar de manera alternativa o adicional de forma simultánea o secuencial con los compuestos en cuestión (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) en los métodos de la presente divulgación.

Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) a un sitio de tejido objetivo, proporcionando una estructura para el

tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIB. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

5 La elección del material de matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcificosfato, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, como el hueso o el colágeno dérmico. Las matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras posibles matrices no son biodegradables y están definidas químicamente, como hidroxiapatita sinterizada, biocristal, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcificosfato. La composición biocerámica puede alterarse, como en el aluminato fosfato de calcio y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

Los métodos de la presente divulgación pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, saquitos, píldoras, tabletas, pastillas (usando una base aromatizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

25 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente divulgación pueden mezclarse con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes reguladores. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

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

50 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes de isoestearilo, polioxietilén sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

55 Ciertas composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía tópica, ya sea a la piel o a las membranas mucosas. Las formulaciones tópicas pueden incluir además uno o más de la amplia variedad de agentes que se sabe que son efectivos como potenciadores de la penetración de la piel o el estrato córneo. Ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, dimetilsulfóxido y azona. Se pueden incluir además agentes adicionales para hacer que la formulación sea cosméticamente aceptable. Ejemplos de estos son grasas, ceras, aceites, colorantes, fragancias, conservantes, estabilizadores y agentes tensioactivos. También se pueden incluir agentes queratolíticos como los conocidos en la técnica. Ejemplos son el ácido salicílico y el azufre.

65 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, regulador o propulsor que se requiera. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto objetivo de la presente

divulgación (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

5 Los polvos y aerosoles pueden contener, además de un compuesto objetivo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores habituales, como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, como butano y propano.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRIIB en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que puede contener antioxidantes, reguladores, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las  
15 composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula  
20 requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por  
25 ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

30 Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico tratante considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la presente divulgación (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB). Los diversos factores dependerán de la enfermedad por tratar. En el caso de los trastornos musculares, los factores pueden incluir, entre otros, la cantidad de masa muscular que se desea formar, los músculos más afectados por la enfermedad, la condición del músculo deteriorado, la edad, el sexo y la dieta del paciente, el tiempo de administración y otros  
35 factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final, también puede afectar la dosificación. El progreso se puede monitorear mediante una evaluación periódica del crecimiento y/o reparación muscular, por ejemplo, mediante pruebas de fuerza, evaluación por MRI del tamaño muscular y análisis de biopsias musculares.

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

En un ejemplo específico, se han descrito una variedad de factores osteogénicos, inductores de cartílago e inductores de hueso, particularmente bifosfonatos. Véanse, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Europea Nos. 148,155 y 169,016. Por ejemplo, otros factores que pueden combinarse con los polipéptidos ActRIIB objetivo incluyen diversos  
50 factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento similar a insulina (IGF).

La presente divulgación también proporciona terapia génica para la producción in vivo de polipéptidos ActRIIB. Dicha  
55 terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de ActRIIB en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. El suministro de secuencias de polinucleótidos de ActRIIB se puede lograr usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere el uso terapéutico de secuencias de polinucleótidos de ActRIIB para su uso de liposomas específicos.

60 Varios vectores virales que se pueden utilizar para la terapia génica como se enseña aquí incluyen adenovirus, virus del herpes, vacuna o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen foráneo incluyen, entre otros: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios  
65 vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o

incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos para el objetivo uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La orientación preferida se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicos pueden insertarse en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir la administración específica del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIB. El vector puede estar dirigido a células/tejidos óseos, cartilagosos, musculares o neuronales.

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

Otro sistema de suministro dirigido para polinucleótidos de ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta divulgación es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia eficiente de genes usando un vehículo de liposomas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible basándose, por ejemplo, en la especificidad de órganos, especificidad de células y especificidad de orgánulos, y es conocido en la técnica.

### Ejemplificación

La invención que ahora se describe en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no están destinados a limitar la invención.

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

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

ActRIIb-hFc se muestra a continuación tal como fue purificado de líneas celulares CHO

(SEQ ID NO: 5)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC  
 WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTG  
GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTI  
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

(i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 7)

(ii) Activador de plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 8)

(iii) Nativo: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 9).

La forma seleccionada emplea la guía TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEG  
EQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF  
CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

Este polipéptido es codificado por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 10)

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

10

La secuenciación N-terminal del material producido con células CHO reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 11). De forma notable, otros constructos reportados en la literatura comienzan con una secuencia -SGR...

15

La purificación se puede lograr mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de regulador.

20

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

25

Ejemplo 2: Generación de mutantes ActRIIb-Fc

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

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG  
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPTAPT  
GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP  
PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Se introdujeron diversas mutaciones, que incluyen truncamientos N y C-terminales, en la proteína de fondo ActRIIB-Fc. En base a los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que estos constructos, si se expresan con un líder TPA, carecerán de la serina N-terminal. Las mutaciones se generaron en el dominio extracelular de ActRIIB por mutagénesis por PCR. Después de la PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, se digirieron con SfoI y AgeI y se purificaron en gel. Estos fragmentos se ligaron en el vector de expresión pAID4 (véase el documento WO2006/012627) de modo que después de la ligación creó quimera de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en E. coli DH5 alfa, se recogieron colonias y se aislaron los ADN. Para los constructos murinos (mFc), se sustituyó una IgG2a murina por la IgG1 humana. Todos los mutantes fueron verificados en cuanto a su secuencia.

Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T por transfección transitoria. En resumen, en un rotador de 500 ml, las células HEK293T se fijaron a  $6 \times 10^5$  células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250 ml y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, estas células se trataron con complejo de ADN: PEI (1:1) a una concentración final de ADN de 0.5 ug/ml. Después de 4 horas, se añadieron 250 ml de medio y las células se cultivaron durante 7 días. Los medios acondicionados se cosecharon haciendo rorar las células y se concentraron.

Los mutantes se purificaron usando una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, la columna de proteína A y se eluyeron con regulador de glicina de pH bajo (3.0). Después de la neutralización, se dializaron contra PBS.

También se produjeron mutantes en células CHO mediante una metodología similar.

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

Ejemplo 2. Bioensayo para GDF-11 y señalización mediada por activina.

Se usó un ensayo de gen informador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc en la señalización por GDF-11 y Activina A. Línea celular: rhabdomyosarcoma humano (derivado de músculo). Vector indicador: pGL3(CAGA)12 (Descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). Véase Figura 5. El motivo CAGA12 está presente en los genes que responden a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores de señalización a través de Smad2 y 3.

Día 1: Dividir las células A-204 en una placa de 48 pozos.

Día 2: Células A-204 transfectadas con 10 µg de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12 (10 µg)+pRLCMV (1 µg) y Fugene.

Día 3: Agregar factores (diluidos en medio+0.1% BSA). Los inhibidores deben preincubarse con factores durante 1 hora antes de agregarlos a las células. 6 horas más tarde, las células se enjuagan con PBS y se lisan las células.

Esto es seguido por un ensayo de luciferasa. En ausencia de inhibidores, la Activina A mostró una estimulación 10 veces mayor de la expresión del gen informador y una DE50 ~ 2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces, ED50: ~ 1.5 ng/ml.

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

Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 de truncamientos N-terminal y C-terminal

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

Truncamientos C-terminal de ActRIIB-hFc:

	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIb-hFc (R64, 20-134)	45	22
ActRIIb-hFc (R64, 20-132)	87	32
ActRIIb-hFc (R64, 20-131)	120	44
ActRIIb-hFc (R64, 20-128)	130	158

Como se puede ver, los truncamientos de tres (terminando con ... PPT), seis (terminando con ... YEP) o más aminoácidos en el C-terminal causan una disminución triple o mayor en la actividad de la molécula. El truncamiento de los 15 aminoácidos finales de la porción ActRIIB provoca una mayor pérdida de actividad (véase el documento WO2006/012627).

Se hicieron truncamientos amino terminales en el fondo de una proteína ActRIIb-hFc (R64 20-131). Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios condicionados):

10 Truncamientos N-terminal de ActRIIb-hFc:

	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIb-hFc (R64, 20-131) (GRG...)	183	201
ActRIIb-hFc (R64, 21-131) (RGE...)	121	325
ActRIIb-hFc (R64, 22-131) (GEA...)	71	100
ActRIIb-hFc (R64, 23-131) (EAE...)	60	43
ActRIIb-hFc (R64, 24-131) (AET...)	69	105

De acuerdo con lo anterior, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N conducen a la producción de una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud completa. Experimentos adicionales muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIb-hFc (R64, 25-131) tiene una actividad equivalente a la forma no truncada, y las eliminaciones adicionales en el extremo N continúan degradando la actividad de la proteína. Por lo tanto, los constructos óptimos tendrán un extremo C-terminal que termina entre el aminoácido 133-134 de la SEQ ID NO: 4 y un extremo N que comienza en los aminoácidos 22-24 de la SEQ ID NO: 4. Un N-terminal correspondiente a los aminoácidos 21 o 25 dará una actividad similar al constructo ActRIIb-hFc (R64, 20-134).

Ejemplo 4. Variantes ActRIIb-Fc, actividad basada en células.

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc se probó en un ensayo basado en células, como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 1, a continuación. Algunas variantes se probaron en diferentes constructos de truncamiento C-terminal. Como se discutió anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos causaron una reducción en la actividad. Sorprendentemente, las variantes L79D y L79E mostraron una pérdida sustancial de la unión a la activina a la vez que conservaban la inhibición casi salvaje del GDF-11.

30 La unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF11 y Activina A:

Variaciones ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de SEQ ID NO: 4)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
64R	20-134	+++ (aprox. 10 <sup>-8</sup> M Ki)	+++ (aprox. 10 <sup>-8</sup> M Ki)
64A	20-134	+ (aprox. 10 <sup>-6</sup> M Ki)	+ (aprox. 10 <sup>-6</sup> M Ki)
64R	20-129	+++	+++
64R K74A	20-134	++++	++++
64R A24N	20-134	+++	+++

Variaciones ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de SEQ ID NO: 4)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
64R A24N	20-119	++	++
64R A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ Actividad pobre (aproximadamente $1 \times 10^{-6}$ Ki) ++ Actividad moderada (aproximadamente $1 \times 10^{-7}$ Ki) +++ Actividad buena (tipo salvaje) (aproximadamente $1 \times 10^{-8}$ Ki) ++++ Mayor que la actividad de tipo salvaje			

5 Se han evaluado varias variantes para la vida media en suero en ratas. ActRIIB (R64 20-134)-Fc tiene una vida media en suero de aproximadamente 70 horas. ActRIIB (R64 A24N 20-134)-Fc tiene una vida media en suero de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividad en el ensayo basado en células (arriba) y en los ensayos in vivo (abajo) que son equivalentes a la molécula de tipo salvaje. Junto con la vida media más larga, esto significa que con el tiempo una variante A24N dará un mayor efecto por unidad de proteína que la molécula de tipo salvaje.

10 Sorprendentemente, la introducción de aminoácidos ácidos (ácido aspártico o glutámico) en la posición 79 disminuyó selectivamente la unión de activina mientras se retiene la unión de GDF11/GDF8. Como se discute a continuación, las proteínas ActRIIB-Fc de tipo salvaje parecen tener efectos en otros tejidos además del músculo, algunos de los cuales pueden ser indeseables. Como se describe en el presente documento, se espera que estos efectos se relacionen con los diferentes ligandos que están unidos e inhibidos por ActRIIB-Fc, incluida, quizás, la activina. Los datos iniciales indican que, en ratones, las variantes L79E y L79D tienen efectos reducidos en otros tejidos además del músculo, mientras que conservan sus efectos en el músculo. Aunque las variaciones de este tipo pueden verse como variantes de ActRIIB, debe tenerse en cuenta que estas proteínas ya no funcionan realmente como receptores de activina y, por lo tanto, el apodo "ActRIIB" es apropiado solo como un indicador de la derivación de estos polipéptidos. Aunque los residuos ácidos en la posición 79 disminuyen la unión de activina mientras retienen la unión de GDF11, otras alteraciones en esta posición no tienen este efecto. Un cambio de L79A aumenta la unión de activina en relación con la unión de GDF11. Un cambio de L79P disminuye tanto la unión de activina como de GDF11.

Ejemplo 5. Unión de GDF-11 y activina A.

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

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

30 Variantes de especificidad de unión IIB a ligando.

Proteína	GDF11		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11

ES 2 796 347 T3

GDF11			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
GDF8			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)			
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB-hFc (R64, K74A 20-134)	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11

Activina A			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)			Bajo enlace
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)			Bajo enlace
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

5 Estos datos confirman los datos del ensayo basado en células, lo que demuestra que la variante A24N retiene la actividad de unión al ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB-hFc (R64 20-134), y que la molécula L79D o L79E retiene la miostatina y unión a GDF11 pero muestra una unión marcadamente disminuida (no cuantificable) a Activina A.

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

Variantes solubles de ActRIIB-Fc que se unen a GDF11 y Activina A (ensayo BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
15cola	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*

ActRIIB	ActA	GDF11
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	--
* Sin unión observada -- unión <1/5 WT - ~unión 1/2 + WT ++ <2x unión incrementada +++ ~5x unión incrementada ++++ ~10x unión incrementada +++++ ~40x unión incrementada		

Ejemplo 6: El efecto de las proteínas ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones de tipo salvaje.

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

10 Se dosificaron ratones C57Bl10 (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) dos veces/semana con la proteína humana ActRIIB (R64 20-134) o con el ActRIIB humano (K74A 20-134). Los ratones se exploraron por RMN el día 0 y el día 28 para determinar el cambio porcentual de la masa de tejido magro de todo el cuerpo. Los ratones tratados con ActRIIB humano (R64 20-134)-Fc exhibieron un aumento significativo del 31.1% en el tejido magro en comparación con el grupo de control del vehículo. Los ratones tratados con la proteína humana ActRIIB (K74A 20-134)-Fc exhibieron un aumento significativo en el aumento de masa de tejido magro en comparación con la cohorte de control, aunque en menor medida que el grupo tratado con ActRIIB humano (R64 20-134). En un estudio similar, los ratones fueron tratados dos veces/semana con PBS, 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de ActRIIB murino (WT, 20-134)-Fc, por vía intraperitoneal. Al final del estudio, se diseccionaron y pesaron los músculos femoral, gastrocnemio, pectoral y diafragma. Los resultados se resumen en la Tabla 3, a continuación.

15 Tabla 3: Pesos tisulares de ratones de tipo salvaje tratados con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc tratados con vehículo y murino

ES 2 796 347 T3

Tratado con vehículo	Gastrocnemios (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales(L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) ± Desviación estándar	0.306 ± 0.020	0.187 ± 0.040	0.257 ± 0.020	0.076 ± 0.020
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10mg/kg)	Gastrocnemios (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) ± Desviación estándar	0.387 ± 0.010	0.241 ± 0.014	0.360 ± 0.070	0.124 ± 0.040
valor p de prueba T	0.0001	0.009	0.02	0.04

Como se muestra en la Tabla 3, la proteína de fusión ActRIIB (WT, 20-134)-Fc murina aumenta significativamente la masa muscular en ratones de tipo salvaje. En los ratones tratados con ActRIIB murino (WT, 20-134)-Fc, los músculos gastrocnemios aumentaron 26.5%, los músculos femorales aumentaron 28.9%, los músculos pectorales aumentaron 40.0%. También se observaron cambios en el músculo del diafragma que aumentaron en un 63% en comparación con los ratones de control tratados con vehículo. La disminución del músculo del diafragma es una complicación común en una variedad de distrofias musculares. Por lo tanto, el aumento en el peso del diafragma visto después del tratamiento murino con ActRIIB (WT, 20-134)-Fc podría ser de importancia clínica.

5 Ejemplo 7: El efecto de las proteínas ActRIIB-Fc de vida media larga en la masa muscular en ratones de tipo salvaje.

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

15 Los ratones C57Bl10 se dosificaron (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) dos veces/semana con la proteína humana ActRIIB-mFc (R64 20-134) o la ActRIIB-mFc humana (R64, A24N 20-134). Los ratones se exploraron mediante RMN en varios puntos hasta el día 25 para determinar el cambio porcentual de la masa de tejido magro de todo el cuerpo. Ambas moléculas causaron aumentos equivalentes en el peso corporal total y las masas musculares, con los efectos sobre el gastrocnemio, el femoral y los músculos pectorales que van desde un aumento del 40-70%. Ver Figuras 5 y 6.

Estos datos demuestran que la forma con vida media aumentada de la molécula promueve el crecimiento muscular en un estudio a corto plazo con una potencia equivalente a la molécula de tipo salvaje.

25 Ejemplo 8: El efecto de las proteínas ActRIIB-Fc con unión reducida a activina sobre la masa muscular en ratones de tipo salvaje.

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

30 Se dosificaron ratones C57Bl10 (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) dos veces/semana con la proteína humana ActRIIB-mFc (R64 20-134) o con ActRIIB-mFc humana (R64, L79D 20-134). Los ratones fueron escaneados por RMN en varios puntos hasta el día 24 para determinar el cambio porcentual de la masa de tejido magro de todo el cuerpo. Los datos se muestran en la tabla a continuación.

35

	Peso corporal Día 0 (g)	Peso corporal día 24 (g)	Gastrocnemios (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)
Mod. TBS (p/v)	24.4 ± 1.51	26.8 ± 1.43	0.29 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.24 ± 0.05

(continuación)

	Peso corporal Día 0 (g)	Peso corporal día 24 (g)	Gastrocnemios (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)
R64, 20-134 (10 mg/kg)	25.0 ± 1.36	31.2* ± 1.53	0.40* ± 0.02	0.24* ± 0.02	0.37* ± 0.07
R64, L79D, 20-134 (10 mg/kg)	25.3 ± 1.22	28.1 ± 1.64	0.32* ± 0.02	0.20* ± 0.02	0.27 ± 0.05
					* p < 0.05

Estos datos demuestran que la variante L79D (unión a Activina A reducida) de ActRIIB es activa in vivo para promover el crecimiento muscular, sin embargo, la cantidad de crecimiento muscular es menor que la de ActRIIB de tipo salvaje. Este efecto disminuido puede ser causado en parte por la ligera reducción en la unión de miostatina o por la pérdida de unión a un regulador negativo adicional, aún desconocido, del crecimiento muscular. La capacidad de estimular el crecimiento muscular sin afectar la señalización de Activina A es altamente deseable porque la activina es una molécula reguladora ampliamente expresada de la que se sabe que tiene efectos sobre el sistema reproductivo, los huesos, el hígado y muchos otros tejidos. En ratones, ActRIIB-mFc (R64 20-134) causa efectos sustanciales en el sistema reproductivo y, en algunos casos, provoca un aumento en el tamaño del bazo. La molécula ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134) tuvo efectos muy atenuados tanto en los tejidos reproductivos como en el bazo, lo que indica que esta molécula será particularmente adecuada para promover el crecimiento muscular en pacientes que son reproductivamente activos o desean minimizar los efectos en el sistema reproductivo.

Ejemplo 9: El efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la masa muscular y la fuerza en ratones Mdx.

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

Se trataron ratones adultos Mdx dos veces/semana con la proteína murina ActRIIB (WT, 20-134)-Fc (1, 3 o 10 mg/kg; intraperitoneal) o un control de vehículo PBS. Se mide la fuerza que ejerce un ratón cuando tira de un transductor de fuerza para determinar la fuerza de agarre de las extremidades anteriores. La fuerza promedio de 5 ensayos de tracción se utilizó para comparar la fuerza de agarre entre las cohortes. Al final del estudio, se diseccionaron y pesaron los músculos femorales, gastrocnemio, pectoral y diafragma. Las mediciones de la fuerza de agarre también mostraron un aumento significativo. Los resultados de la masa muscular se resumen en la tabla a continuación.

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

Tratado con vehículo	Gastrocnemios (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) ± Deviación estándar	0.413 ± 0.040	0.296 ± 0.019	0.437 ± 0.060	0.111 ± 0.030
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	Gastrocnemios (L+R)	Femoris (L+R)	Pectoralis (L+R)	Diafragma
Promedio (gramos) ± Deviación estándar	0.52 ± 0.050	0.39 ± 0.05	0.807 ± 0.21	0.149 ± 0.020
Prueba de valor p	0.0006	0.0006	0.002	0.05

Como se ilustra en la tabla, los grupos tratados con ActRIIB murino (WT, 20-134)-Fc exhiben una mayor masa de tejido magro en los ratones mdx en comparación con los ratones tratados con PBS. El tratamiento con ActRIIB-Fc aumentó el tamaño del gastrocnemio en 25.9%, el tamaño de los femorales en 31.8%, y los músculos pectorales en 85.4% en comparación con el grupo de control con vehículo. De posible importancia clínica, también se encontró que los pesos de diafragma de los ratones tratados con ActRIIB de ratón (WT, 20-134)-Fc se incrementaron 34.2% en comparación con la cohorte de control. Estos datos demuestran la eficacia de la proteína ActRIIB-Fc en una enfermedad de distrofia muscular.

Adicionalmente ratones mdx tratados con la exposición de la proteína ActRIIB-Fc aumentaron la fuerza de agarre en comparación con los controles tratados con vehículo. A las 16 semanas, los grupos con 1, 3 y 10 mg/kg de ActRIIB demostraron un 31.4%, 32.3% y 64.4% de aumento en la fuerza de agarre, respectivamente, en comparación con el grupo de control con vehículo. El rendimiento de la fuerza de agarre mejorada de los grupos tratados con la ActRIIB murina (WT, 20-134)-Fc apoya la idea de que el aumento del músculo que se encuentra en los grupos de tratamiento

es fisiológicamente relevante. Los ratones mdx son susceptibles a lesión contráctil inducida y experimentan significativamente más ciclos de degeneración y regeneración que sus contrapartes de tipo salvaje. A pesar de estos fenotipos musculares, el tratamiento con ActRIIB murina (WT, 20-134) -Fc aumenta la fuerza de agarre en los ratones mdx.

5 En la distrofia muscular de Duchenne, el inicio de la enfermedad ocurre temprano en la infancia, a menudo tan pronto como los cinco años. En consecuencia, los datos presentados anteriormente con respecto a los ratones adultos no reflejan necesariamente los efectos que una molécula de ActRIIB tendría en niños con DMD. Para abordar esto, se realizó un estudio con ratones mdx juveniles.

10 El tratamiento con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) aumenta significativamente el peso corporal en ratones juveniles (cuatro semanas de edad) C57BL/10 y mdx. El análisis de la composición corporal usando espectroscopía de RMN in vivo reveló un aumento en la masa de tejido magro acompañado de pesos corporales más altos. Los ratones C57BL/10 tratados con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) ganaron un 35.2% de masa de tejido magro y el grupo mdx tratado ganó un 15  
15 48.3% más de masa de tejido magro que sus respectivas cohortes de control. Además, se evaluó el efecto del tratamiento ActRIIB-mFc (R64, 20-134) sobre la fuerza. Los puntajes de fuerza de agarre de los ratones mdx tratados con vehículo fueron 15.7% más bajos que la cohorte C57BL/10 con vehículo, lo que ilustra la debilidad muscular asociada con la deficiencia de distrofina. En contraste, los ratones mdx tratados con ActRIIB-mFc (R64, 20-134) mejoraron su fuerza de agarre en comparación con el grupo de vehículos mdx, y lograron mediciones de fuerza de agarre que superaron a los ratones con vehículo C57BL/10 y alcanzaron el nivel de los puntajes de fuerza de agarre de los C57BL/10 tratados (mdx del vehículo:  $0.140 \pm 0.01$  KgF; mdx tratado:  $0.199 \pm 0.02$  KgF; vehículo C57BL/10:  $0.166 \pm 0.03$ ;  $0.205 \pm 0.02$  KgF). Sorprendentemente, el tratamiento devolvió a los ratones mdx juveniles a niveles de fuerza de agarre de tipo salvaje. Por lo tanto, es probable que la molécula ActRIIB-mFc (R64, 20-134) tenga importantes aplicaciones clínicas en la distrofia muscular de Duchenne, particularmente en pacientes jóvenes a una edad cercana al inicio de la enfermedad.

Ejemplo 7: El efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la fuerza y la supervivencia en ratones SOD1.

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

35 Los ratones B6.Cg-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J, o SOD1, portan altos números de copias del alelo mutante del transgen superóxido dismutasa humana. Los altos niveles de esta proteína transmiten un fenotipo a los ratones que es comparable a la enfermedad humana ALS. Los ratones SOD1 desarrollan parálisis ascendente y muestran signos tempranos de la enfermedad a los 91 días. La enfermedad provoca la muerte prematura entre las 19 y las 23 semanas de edad.

40 Se dosificaron ratones SOD1 con un control de vehículo o ActRIIB-mFc (K74A 20-134) (por ejemplo, 5 mg/kg, dos veces/semana) a partir de las 10 semanas de edad. La fuerza que ejerce un ratón al tirar de un transductor de fuerza es una medida de la fuerza de agarre de las extremidades anteriores. La fuerza promedio de 5 ensayos de tracción se utilizó para comparar la fuerza de agarre entre las cohortes. La supervivencia se calculó como el número de días entre la fecha en que nació el ratón y la fecha en que el ratón no pudo enderezarse dentro de los 30 segundos posteriores a su colocación. La figura 7 muestra las medidas de fuerza de agarre y la figura 8 ilustra los datos de supervivencia.

45 Los ratones en la etapa final de la enfermedad tienen dificultades para acicalarse, presumiblemente debido a la progresión de la parálisis, y parecen descuidados. La observación en transcurso de los ratones reveló que el grupo de tratamiento con ActRIIB murino (K74A 20-134)-Fc parecía estar bien preparado incluso en las etapas finales de la enfermedad en comparación con el grupo con PBS. Esta observación sugiere que los ratones tratados gozan de mejor salud y mantienen una mejor calidad de vida que los controles.

50 Como se ve en la figura 7, los ratones SOD1 que reciben el tratamiento con ActRIIB murino (K74A 20-134)-Fc exhiben una fuerza de agarre significativamente mayor en comparación con la cohorte de control con PBS. Esto se observa en el día 117, la etapa inicial de la enfermedad, así como después de que la enfermedad haya progresado en el día 149. La Figura 8 ilustra que los ratones tratados con ActRIIB (K74A 20-134)-Fc sobrevivieron significativamente más tiempo que los controles con vehículo. Este estudio ilustra la utilidad del ActRIIB murino (K74A 20-134)-Fc en el modelo de ratón de ALS para mejorar tanto la fuerza como la supervivencia de los ratones.

60 Se realizó un experimento similar con ratones SOD1, pero el tratamiento se retrasó hasta el comienzo del inicio de la enfermedad ampliamente detectable (día 130), a fin de imitar mejor el tratamiento de la ELA humana después del inicio de síntomas significativos de la enfermedad. En el día 130, los ratones SOD1 se dividieron en grupos tratados con vehículo (TBS modificado) o ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg). Los ratones fueron dosificados por vía subcutánea una vez por semana. Los ratones fueron explorados por RMN en los días de estudio -1 y 27 (edades 129 y 157 días, respectivamente). Las mediciones de la fuerza de agarre se realizaron en los días 0 y 20 del estudio. Al final del estudio, el grupo de control masculino había perdido el 4.3% del peso corporal del día 0 del estudio, mientras

65

que el grupo tratado ganó el 7.8% de los pesos del día 0 del estudio. El grupo de control femenino perdió 1.5% y la cohorte femenina tratada ganó 15% de su peso corporal del día 0 de estudio.

Medición de la fuerza de agarre SOD1

5

	Día 0	Día 20
Macho control	0.149 ± 0.02	0.097 ± 0.02 <sup>a</sup>
Macho ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.147 ± 0.02	0.128 ± 0.02 <sup>a,b</sup>
Hembra control	0.130 ± 0.02	0.091 ± 0.02 <sup>a</sup>
Hembra ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.128 ± 0.01	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>

Mediciones de fuerza de agarre en los días 0 y 20 en ratones SOD1 machos y hembras. El superíndice "a" denota significativamente diferente en comparación con la medida del día 0 respectivo (p<0.05). El superíndice "b" denota una diferencia significativa entre las mediciones del día 20 PBS (Grupo 1) y ActRIIB (R64 20-134)-mFc (Grupo 2) (p<0.05).

10

Los ratones se exploraron mediante RMN para determinar los cambios en la composición corporal atribuidos al tratamiento. Los ratones control machos perdieron 6.0% de su masa de tejido magro en el transcurso del estudio (día -1: 18.2 g ± 1.28; día 27: 17.1 g ± 1.10), los ratones machos tratados ganaron 9.1% de su masa de tejido magro con respecto al día 0 de estudio (día -1: 19.17 g ± 0.77; día 27: 20.92 g ± 0.74). Los ratones control femeninos tuvieron una reducción del 0.83% de la masa magra desde el inicio del estudio (día -1: 13.18 g ± 0.84; día 27: 13.08 g ± 0.71) y los ratones tratados con hembras tuvieron un aumento del 10.7% en su peso corporal al día 0 del estudio (día -1: 13.66 g ± 0.83; día 27: 15.12 g ± 1.21). Los grupos de machos y hembras tratados ganaron cantidades significativas de tejido magro en comparación con sus respectivos grupos de control con PBS (p<0.001).

15

20

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

	Gastrocnemios (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)
Macho Control	0.18 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.04
Macho ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.22 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.30 ± 0.04
Hembra Control	0.13 ± 0.02	0.089 ± 0.016	0.11 ± 0.01
Hembra ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0.17 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.15 ± 0.05

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

25

Ejemplo 8: El efecto de una proteína ActRIIB-Fc sobre la adiposidad y la diabetes en ratones obesos.

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

30

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

35

Los ratones C57BL/6 alimentados con HFD se mantuvieron con una dieta compuesta de 35% de grasa y se consideraron obesos cuando su peso corporal era aproximadamente un 50% mayor que el de los ratones de la misma edad alimentados con una dieta estándar (4.5% de grasa). Los ratones obesos se dosificaron dos veces/semana con un control de vehículo o con ActRIIB humano (R64 K74A 20-134)-Fc (10 mg/kg; i.p.). Los ratones obesos fueron escaneados por RMN para determinar la composición corporal al comienzo de la dosificación y después de 3 semanas de dosificación. Los cambios en la composición corporal desde el inicio se resumen en la figura 9.

40

Los ratones fueron alimentados con un HFD y considerados obesos cuando sus pesos corporales eran 50% más pesados que sus homólogos alimentados con comida estándar. Los ratones alimentados con HFD se dosificaron con un control de vehículo o con ActRIIB murino (R64 K74A 20-134)-Fc (5 mg/kg dos veces/semana; i.p.) durante 35 semanas. Al final del estudio, los ratones estaban en ayunas durante la noche. Al final del ayuno, se recogió sangre y

45

se procesó para suero. Luego se usó suero para determinar los niveles de insulina en ayunas para ambas cohortes. Los resultados para el efecto de ActRIIB murino (K74A 20-134)-Fc sobre los niveles de insulina en ayunas de ratones obesos se resumen en la tabla a continuación.

5 Niveles de insulina en ayunas de ratones tratados con ActRIIB (K74A 20-134)-Fc en vehículos y murinos

	HFD PBS	HFD ActRIIB (K74A 20-134)-mFc Murino
Promedio (ng/ml) ± Desviación estándar	2.27 ± 1.64	0.78 ± 0.40
Prueba t	N/A	0.012

10 La Figura 9 muestra la disminución de la adiposidad de la cohorte con ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc murina en comparación con los controles tratados con vehículo. Se encontró que los ratones tratados tenían una disminución del 25.9% en la masa de grasa en comparación con sus niveles de referencia. Además, el grupo tratado aumentó su masa magra en un 10.1% por encima de sus niveles de referencia. El cambio porcentual tanto en el tejido adiposo como en la masa de tejido magro del ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc fue significativamente mayor que los cambios porcentuales del grupo tratado con PBS.

15 En este modelo, los ratones se mantuvieron con una dieta alta en grasas hasta que fueron >50% más pesados que sus homólogos alimentados con comida. En base a este notable aumento en el peso corporal y la adiposidad, es lógico pensar que este modelo podría corresponder a humanos que se caracterizan por ser obesos mórbidos. Por lo tanto, el hallazgo de que el tratamiento con proteína humana ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc reduce la adiposidad en ratones obesos podría ser clínicamente relevante para el tratamiento de humanos con obesidad mórbida.

20 Los resultados resumidos en la Tabla 5 sugieren que el tratamiento con la proteína murina ActRIIB (K74A 20-134)-Fc puede reducir significativamente los niveles elevados de insulina en suero en ayunas asociados con la obesidad. Este hallazgo respalda la posible relevancia clínica del uso de polipéptidos ActRIIB en el tratamiento de la diabetes tipo II.

25 Se llevaron a cabo experimentos adicionales con ActRIIB-mFc (R64 20-134) en el modelo HFD de obesidad y diabetes. Los ratones C57BL/6 alimentados con HFD de 30 semanas de edad se dividieron en 2 grupos (PBS y 10 mg/kg de ActRIIB-mFc (R64 20-134)). Los ratones se pesaron y se dosificaron 2 veces por semana por vía intraperitoneal durante 12 semanas. Los ratones fueron evaluados por RMN en los días de estudio 0 y 94.

30 Los ratones tratados perdieron el 1.9% de su peso corporal del día 0 del estudio, mientras que los ratones tratados con PBS ganaron el 6.7% de su peso corporal inicial durante el estudio. Los ratones tratados también ganaron significativamente más tejido magro que el grupo PBS (21.1% ± 6.28 versus 3.7% ± 4.08) durante el estudio. Los ratones tratados también perdieron tejido graso significativo (-34% ± 10.95) en comparación con el grupo PBS (+10.2 ± 10.18).

35 Los pesos musculares individuales también aumentaron en el grupo tratado con ActRIIB-mFc (R64 20-134).

	Gastrocnemio (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)
PBS	0.33 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.31 ± 0.05
ActRIIB 64 20-134)-mFc	0.44 ± 0.08*	0.25 ± 0.02*	0.44 ± 0.13*

\*p > 0.05

40 Además de los efectos beneficiosos sobre la grasa y el músculo que están asociados con el tratamiento con ActRIIB-Fc en estos ratones, se observaron efectos positivos sobre los lípidos en suero. Los niveles de colesterol y triglicéridos en suero se redujeron de forma notable, lo que sugiere que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc pueden usarse para reducir los niveles de estos lípidos en los pacientes.

45 Ejemplo 9: El efecto de la proteína ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones caquécticos.

Los solicitantes probaron la capacidad de ActRIIB (R64 20-134)-mFc para atenuar la pérdida muscular en un modelo de ratón con desgaste muscular inducido por glucocorticoides.

50 Los ratones se dosificaron por vía subcutánea diariamente durante 13 días con PBS o dexametasona (2 mg/kg) para inducir el desgaste muscular. Durante los mismos 13 días, los grupos tratados con PBS y dexametasona recibieron vehículo o ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg; i.p.; dos veces/semana) de modo que todas las combinaciones de

tratamientos estuvieron representadas. Los ratones se exploraron mediante RMN en los días 0 y 13 para determinar los cambios en la masa de tejido magro en los grupos. Los resultados de RMN se resumen en la Tabla 6, a continuación.

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

Grupo (sc: tratamiento ip)	Promedio magro día 13-Promedio magro día 0 (g) ± desviación estándar
PBS:PBS	0.83 ± 0.94
Dexametasona:PBS	0.47 ± 0.34 <sup>a</sup>
Dexametasona:ActRIIB	2.56 ± 0.37 <sup>a,b</sup>
PBS :ActRIIB	3.63 ± 0.62 <sup>a</sup>
<sup>a</sup> Diferencia significativa en comparación con PBS:PBS a p <0.05	
<sup>b</sup> Diferencia significativa en comparación con dexametasona:PBS a p <0.05	

10 La exploración por RMN mostró una disminución significativa del 2.5% en la masa de tejido magro en el grupo de dexametasona:PBS en comparación con la cohorte PBS:PBS. En contraste, el grupo dexametasona: ActRIIB (R64 20-134)-mFc exhibió un aumento del 13.5% en la masa de tejido magro, un aumento significativo en comparación con los grupos PBS:PBS y dexametasona: PBS. La caquexia es un efecto secundario indeseable para una variedad de tratamientos terapéuticos, incluida la terapia crónica con glucocorticoides. Por lo tanto, podría ser de importancia clínica que el tratamiento con una proteína humana ActRIIB (R64 20-134)-mFc pueda atenuar el desgaste muscular asociado con la caquexia.

15 Ejemplo 10: El efecto de ActRIIB-Fc sobre la masa muscular y la obesidad en ratones envejecidos u ovariectomizados

20 La sarcopenia es una forma de pérdida muscular asociada con el envejecimiento en seres humanos sanos. El trastorno está asociado con una pérdida progresiva de la masa del músculo esquelético y una disminución de la fuerza y la movilidad. Las causas de la sarcopenia son poco conocidas. En las mujeres, la menopausia acelera la pérdida muscular, tanto como lo hace con respecto a la pérdida ósea. En consecuencia, ActRIIB (R64, 20-134)-mFc se probó en ratones extremadamente viejos (dos años) y en ratones ovariectomizados (un modelo del estado posmenopáusico).

25 Ratones hembra C57BL/6 de 8 semanas de edad se ovariectomizaron (OVX) o se operaron de forma simulada y luego se dejaron envejecer hasta 16 semanas antes del comienzo del estudio. Al comienzo del estudio, los ratones simulados y OVX se dividieron en grupos de tratamiento y vehículo. Todos los grupos se pesaron y se dosificaron semanalmente con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc o control de regulador durante 11 semanas. Todos los ratones tuvieron los días 0 y 83 de resonancia magnética nuclear para determinar la composición corporal.

30 Al final del estudio, los ratones PBS falsos habían perdido el 4.7% de su masa magra original, mientras que el grupo tratado con simulación aumentó su masa magra en un 21% en el transcurso del estudio. Los controles OVX perdieron 12.1% (significativamente más que el vehículo simulado) de su masa magra mientras que los ratones OVX tratados ganaron 12.9% al final del estudio.

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

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

% de cambio de masa magra	PBS	10 mg/kg
Promedio (% desde el inicio)	101.76	117.27
(continuación)		
% de cambio de masa magra	PBS	10 mg/kg
Desviación estándar	3.83	3.91

Valor p para PBS	<0.001
------------------	--------

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

Pesos musculares	Gastrocnemio (L+R)	Femorales (L+R)	Pectorales (L+R)
PBS	0.283 ± 0.07	0.156 ± 0.01	0.241 ± 0.07
ActRIIB 64 20-134)-mFc	0.371 ± 0.03*	0.192 ± 0.021*	0.33 ± 0.05*

\*p > 0.05

5

La integridad muscular en la cohorte tratada también pareció ser mayor que la del grupo PBS, ya que aparentemente la grasa intramuscular se redujo y mejoró la citoarquitectura. (véase Figura 10).

10 Estos datos demuestran que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc pueden usarse para tratar el desgaste muscular asociado con la vejez en hombres y mujeres.

Ejemplo 11: El efecto de ActRIIB-Fc en la pérdida muscular asociada con la castración

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

20 Ratones machos C57BL/6 de 8 semanas de edad fueron castrados u sometidos a simulación de operación y luego se les permitió recuperarse durante 3 semanas antes del comienzo del estudio. Los grupos simulados y castrados se subdividieron adicionalmente en grupos PBS y ActRIIB (R64, 20-134)-mFc (10 mg/kg). Los ratones se pesaron y se dosificaron por vía subcutánea una vez/semana durante 12 semanas. Los ratones fueron escaneados por RMN en los días de estudio 0 y 83.

25 En el transcurso del estudio, los ratones simulados PBS ganaron un promedio de 9.72% ± 3.67 y los ratones simulados ActRIIB (R64, 20-134)-mFc ganaron 35.79% ± 3.1 de la masa de tejido magro del día 0 de estudio. Los ratones tratados con PBS castrados perdieron 8.1% ± 4.22 de su masa de tejido magro del día 0 mientras que los ratones castrados tratados ganaron 17.77% ± 3.86. Además, la castración conduce a una mayor adiposidad, pero el tratamiento con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc ayudó a reducir la extensión de la ganancia de masa grasa.

30

Los músculos gastrocnemio y pectoral de ratones con vehículo castrado eran más pequeños que en los ratones PBS simulados (gastrocnemio de castrados: 0.275 ± 0.03 g, pectorales de castrados: 0.196 ± 0,06 g; gastrocnemio en simulados: 0.313 ± 0.02 g, pectorales en simulado: 0.254 ± 0.03 g). El tratamiento con ActRIIB (R64, 20-134)-mFc atenúa significativamente esta disminución inducida por la castración en los pesos musculares (gastrocnemio en castrados: 0.421 ± 0.03g, pectorales en castrados: 0.296 ± 0.06g).

35

Ejemplo 12: Efectos de ActRIIB-Fc sobre la caquexia por cáncer

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

45 Se usaron seis grupos de ratones en el experimento, como sigue:

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

(continuación)

Grupo	Tumores	Tratamiento	Dosis	Paradigma
6	Y	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Preventivo

5 Los grupos 3-6 recibieron  $5 \times 10^6$  células tumorales por vía subcutánea. El grupo 6 comenzó el tratamiento inmediatamente con ActRIIB-Fc dos veces por semana. Los grupos 1-5 comenzaron a dosificarse el día 28 del estudio cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 300-500 mm<sup>3</sup>. Como se muestra en la Figura 11, ActRIIB-Fc disminuyó de forma notable la pérdida muscular asociada con los tumores CT26, tanto en ratones con tumores establecidos como cuando se usa en un modelo preventivo antes de la introducción del tumor.

10 **Ejemplo 13: El efecto de las variantes de ActRIIB-Fc sobre la masa muscular en ratones de tipo salvaje.**

Este estudio mostró los efectos de los siguientes constructos de Fc relacionados con ActRIIB sobre la masa muscular y otros tejidos en ratones machos C57BL/6 de 6 semanas de edad. Los ratones se pesaron e inyectaron por vía intraperitoneal, quincenalmente con PBS o un constructo de Fc relacionado con ActRIIB (10 mg/kg): ActRIIB (R64 20-134)-Fc

15 ActRIIB (L79D 20-134)-Fc

ActRIIB (L79E 20-134)-Fc

20 ActRIIB (A24N 20-134)-Fc

ActRIIB (R64K 20-134)-Fc

25 Los ratones se exploraron mediante RMN al principio, a la mitad y al final del estudio. Los músculos femoral, pectoral y gastrocnemio y el hígado, los riñones y el bazo se pesaron y se guardaron en formalina.

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

35 Listado de secuencias

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> VARIANTES DERIVADAS DE ACTRIIB Y USOS DE LOS MISMOS

40 <130> P47899EP4/NJL

<140>

<141> 2008-02-04

45 <150> 60/899,304

<151> 2007-02-02

50 <150> 60/927,088

<151> 2007-05-01

<150> 60/931,880

55 <151> 2007-05-25

<160> 25

60 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 116

65 <212> PRT

ES 2 796 347 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

5

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

<210> 2

10 <211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 2

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

ES 2 796 347 T3

1				5						10					15
Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr
			20					25					30		
Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg
		35					40					45			
Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg
	50					55					60				
Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp
65					70					75					80
Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn
				85					90					95	
Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg
			100					105					110		
Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro
		115					120					125			
Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu
	130					135					140				
Pro	Ile	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Trp	Met	Tyr
145					150					155					160
Arg	His	Arg	Lys	Pro	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Asp	Ile	His	Glu	Asp	Pro
				165					170					175	
Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu
			180					185					190		
Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Gly	Cys	Val	Trp	Lys	Ala	Gln
		195				200						205			
Leu	Met	Asn	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Leu	Gln	Asp	Lys
	210					215					220				
Gln	Ser	Trp	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Pro	Gly	Met	Lys
225					230					235					240
His	Glu	Asn	Leu	Leu	Gln	Phe	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Ser	Asn
			245					250						255	
Leu	Glu	Val	Glu	Leu	Trp	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Lys	Gly	Ser
			260					265					270		
Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Trp	Asn	Glu	Leu	Cys
		275					280					285			
His	Val	Ala	Glu	Thr	Met	Ser	Arg	Gly	Leu	Ser	Tyr	Leu	His	Glu	Asp
	290					295					300				
Val	Pro	Trp	Cys	Arg	Gly	Glu	Gly	His	Lys	Pro	Ser	Ile	Ala	His	Arg
305					310					315					320
Asp	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Val	Leu	Leu	Lys	Ser	Asp	Leu	Thr	Ala	Val
				325					330					335	

ES 2 796 347 T3

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro  
 340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu  
 355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile  
 370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys  
 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu  
 405 410 415

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

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

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

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

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

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

<210> 3

5 <211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 3

```
tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgccaa ctgggagctg 60
gagcgcacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120
tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180
ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg cactgagga gaacccccag 240
gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca tttgccagag 300
gctggggggcc cgggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc 348
```

15 <210> 4

<211> 1539

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 796 347 T3

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60  
 cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120  
 accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcaactgctac 180  
 gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240  
 gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccagggtgtac 300  
 ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgttca ctcatattgcc agaggctggg 360  
 ggcccggaag tcacgtacga gccacccccg acagcccca cctgctcac ggtgctggcc 420  
 tactcaactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480  
 cggcatcgca agcccccta cggatcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

ccatcccctc tggtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggggcgc 600  
 tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttcca 660  
 ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720  
 cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcag gctccaacct cgaagtagag 780  
 ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840  
 atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatal 900  
 ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgccacagg 960  
 gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020  
 ggcttggtg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacgg acaggtaggc 1080  
 acgagacgg acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140  
 ttctgctgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc 1200  
 aaggctgcag acggaccctg gtagtagtac atgtgccct ttgaggaaga gattggccag 1260  
 cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320  
 aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc 1380  
 tgggacatg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440  
 attcggaggt cgggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500  
 accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

5

<210> 5

<211> 343

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 5

ES 2 796 347 T3

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

ES 2 796 347 T3

	180		185		190														
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp				
		195					200					205							
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu				
	210					215					220								
Pro	Val	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg				
225				230						235					240				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys				
				245					250					255					
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp				
			260					265					270						
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys				
		275					280					285							
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser				
	290					295					300								
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser				
305					310					315					320				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser				
				325					330					335					
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys													
			340																

<210> 6

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 6

Thr Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 7

20 <211> 21

<212> PRT

25 <213> Apis mellifera

<400> 7

ES 2 796 347 T3

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

Ser Tyr Ile Tyr Ala  
20

<210> 8

5 <211> 22

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

10

<220>

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

15 <400> 8

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

Ala Val Phe Val Ser Pro  
20

<210> 9

20

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Organismo desconocido

<220>

<223> Descripción del organismo desconocido: péptido nativo

30

<400> 9

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

Ser Ser Gly Ala  
20

35 <210> 10

<211> 1107

<212> ADN

40

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 10

ES 2 796 347 T3

```

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

```

<210> 11

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 11

```

Gly Arg Gly Glu Ala Glu
  1           5

```

<210> 12

20

<211> 344

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

30

<400> 12

ES 2 796 347 T3

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

ES 2 796 347 T3

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

<210> 13

5 <211> 225

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

15 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (43)

20 <223> Asp o Ala

<220>

25 <221> MOD\_RES

<222> (100)

<223> Lys o Ala

30 <220>

<221> MOD\_RES

35 <222> (212)

<223> Asn o Ala

ES 2 796 347 T3

<400> 13

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

Lys  
 225

5

<210> 14

<211> 5

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 14

**Ser Gly Gly Gly Gly**  
1 5

5 <210> 15  
<211> 6  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintética 6x Etiqueta His  
<400> 15

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

20 <210> 16  
<211> 368  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético  
<400> 16

ES 2 796 347 T3

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

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

Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn  
35 40 45

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

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys  
65 70 75 80

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

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

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro  
115 120 125

Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr  
130 135 140

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
165 170 175

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
180 185 190

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
195 200 205

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
210 215 220

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
225 230 235 240

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr  
245 250 255

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
260 265 270

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

ES 2 796 347 T3

	275		280		285														
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser			
	290						295					300							
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp			
	305					310					315					320			
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser			
					325					330					335				
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala			
				340					345					350					
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
			355					360					365						
	<210>	17																	
5	<211>	116																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Homo sapiens																	
10	<400>	17																	
	Ile	Leu	Gly	Arg	Ser	Glu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Phe	Phe	Asn	Ala	Asn			
	1				5					10					15				
	Trp	Glu	Lys	Asp	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Val	Glu	Pro	Cys	Tyr	Gly			
				20					25					30					
	Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	His	Cys	Phe	Ala	Thr	Trp	Lys	Asn	Ile	Ser			
			35					40					45						
	Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Ile	Asn			
		50					55					60							
	Cys	Tyr	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Val	Glu	Lys	Lys	Asp	Ser	Pro	Glu	Val			
	65					70					75					80			
	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Met	Cys	Asn	Glu	Lys	Phe	Ser	Tyr			
					85					90					95				
	Phe	Pro	Glu	Met	Glu	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Pro			
				100					105						110				
	Lys	Pro	Pro	Thr															
				115															
15	<210>	18																	
	<211>	115																	
	<212>	PRT																	
20	<213>	Homo sapiens																	

ES 2 796 347 T3

<400> 18

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

5

<210> 19

<211> 150

10 <212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 19

15

ES 2 796 347 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145 150

<210> 20

5 <211> 150

<212> PRT

<213> Sus sp.

10

<400> 20

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

ES 2 796 347 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
   145  150

<210> 21

5 <211> 150

<212> PRT

<213> Mus sp.

10 <400> 21

ES 2 796 347 T3

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
 35 40 45  
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
 50 55 60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
 85 90 95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
 100 105 110  
 Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
 115 120 125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser

145

150

<210> 22

5 <211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 22

ES 2 796 347 T3

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

<210> 23

5 <211> 150

<212> PRT

<213> Bos sp.

10

<400> 23

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

ES 2 796 347 T3

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

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

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

Pro Val Gly Gly Leu Ser  
 145 150

<210> 24

5 <211> 150

<212> PRT

<213> Xenopus sp.

10

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Val Gly Leu Ser Met  
 145 150

15 <210> 25

<211> 150

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

ES 2 796 347 T3

<400> 25

5

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína ActRIIB variante para su uso en el tratamiento de la caquexia, en donde la proteína ActRIIB variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2, en donde la proteína comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 2.
- 10 2. La variante de proteína ActRIIB para su uso de la reivindicación 1, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2.
3. La variante de proteína ActRIIB para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende un R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 2.
- 15 4. La variante de proteína ActRIIB para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende un D o un E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 2.
- 20 5. La variante de proteína ActRIIB para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 22-25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en un aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 131, 133 o 134 de la SEQ ID NO: 2.
- 25 6. La variante de proteína ActRIIB para su uso de la reivindicación 5, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 2 y termina en el aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 2.
- 30 7. La proteína variante ActRIIB para su uso de cualquier reivindicación precedente, en donde la proteína es un homodímero.
8. La proteína variante ActRIIB para su uso de cualquier reivindicación precedente, en donde la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga.
- 35 9. La variante de proteína ActRIIB para su uso de la reivindicación 8, en donde la porción heteróloga comprende una región constante de una cadena pesada de IgG.
10. La variante de proteína ActRIIB para su uso de la reivindicación 9, en donde la porción heteróloga comprende un dominio Fc.
- 40 11. La variante de proteína ActRIIB para su uso de la reivindicación 10, en donde la proteína de fusión comprende además un dominio enlazante colocado entre el polipéptido ActRIIB y el dominio Fe.
- 45 12. La variante de proteína ActRIIB para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y un aminoácido conjugado con una unidad estructural lipídica.
- 50 13. La variante de proteína ActRIIB para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde la proteína comprende además una secuencia de purificación seleccionada de: una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST.
14. La variante de proteína ActRIIB para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde la variante de proteína ActRIIB inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células.

## ES 2 796 347 T3

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

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GC

WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT

Figura 1

Secuencia del precursor ActRIIB humano designado como SEQ ID NO: 2  
(NM\_001106, 512 aa).

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRL  
HC

YASWRN<sup>1</sup>SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL  
PE

AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHED  
PG

PPPPSPLVGLKPLQLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIF  
ST

PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAET  
MS

RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPP  
GD

THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYM  
LP

FEEEIGQHPSLEELQE<sup>2</sup>VVHKKMRPTIKDHWLKH<sup>3</sup>PGLAQLCVTIEECWDHDAEARLS  
AG

CVEERVSLIRRSVNGTTS<sup>4</sup>DCLVSLVTSVTNVDLPPKESI

Figura 2

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

```
tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcactactacaacgccaaactgggagctggagcgcacc  
aaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgc  
aacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgatagg  
caggagtgtgtggccactgaggagaacccccagggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaac  
gagcgttcactcatttgccagaggctgggggcccgaagtacgtacgagccacccccgacagcccc  
acc
```

**Figura 3**

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

```
atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggctctgggctggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctg
gagcgtgcaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtggtggcc
actgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttctactcat
ttgccagaggctggggggccggaagtacgtaacgagccacccccgacagccccaccctgctcacggtg
ctggcctactcactgctgcccacgggggccttccctcatcgtcctgctggccttttggatgtaccgg
catcgcaagccccctacgggtcatgtggacatccatgaggaccctgggcctccaccaccatcccctctg
gtggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcggggcgctttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcatgtgctgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgcccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggtgttcga
tttgagccagggaaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacgagacggatgatggctcctgag
gtgctcgagggagccatcaacttccagagagatgccttccctgcgcattgacatgtatgccatggggttg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggaccctggatgagtacatgctgccttt
gaggaagagattggccagcacccttctgttggaggagctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcactggttgaaacacccggcctggcccagctttgtgtgacctcgaggagtgc
tgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgaggctgtgtggaggagcgggtgtccctgattcggagg
tcggtcaacggcactacctcgactgtctcgttccctggtgacctctgtcaccaatgtggacctgcc
cctaaagagtcaagcatctaa
```

Figura 4

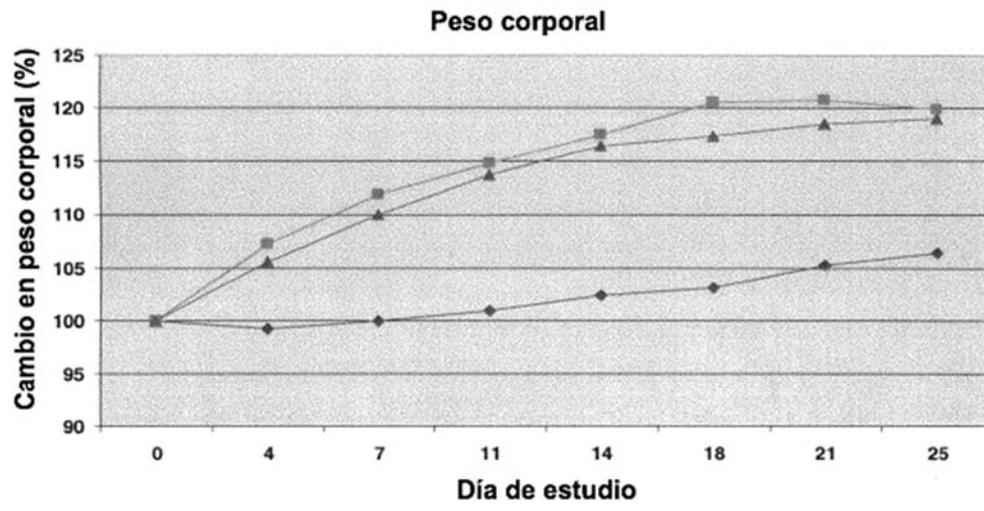


Figura 5

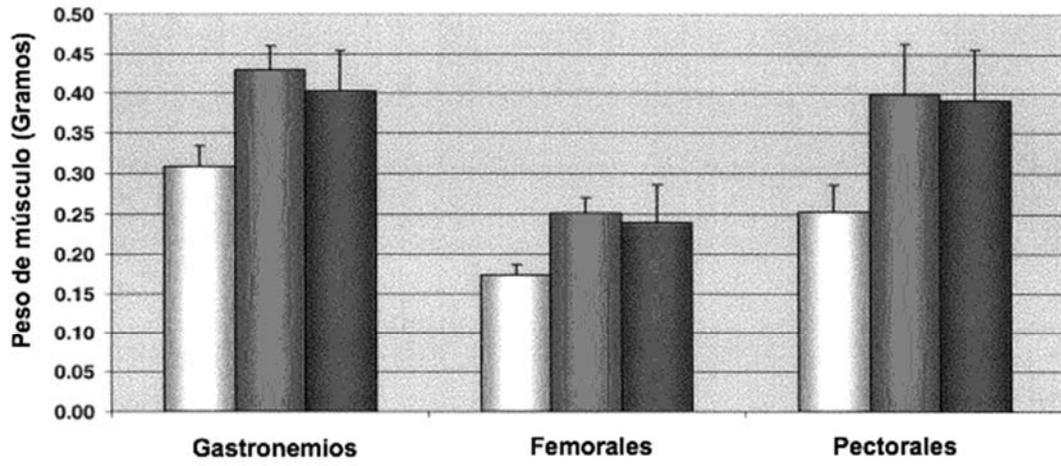


Figura 6

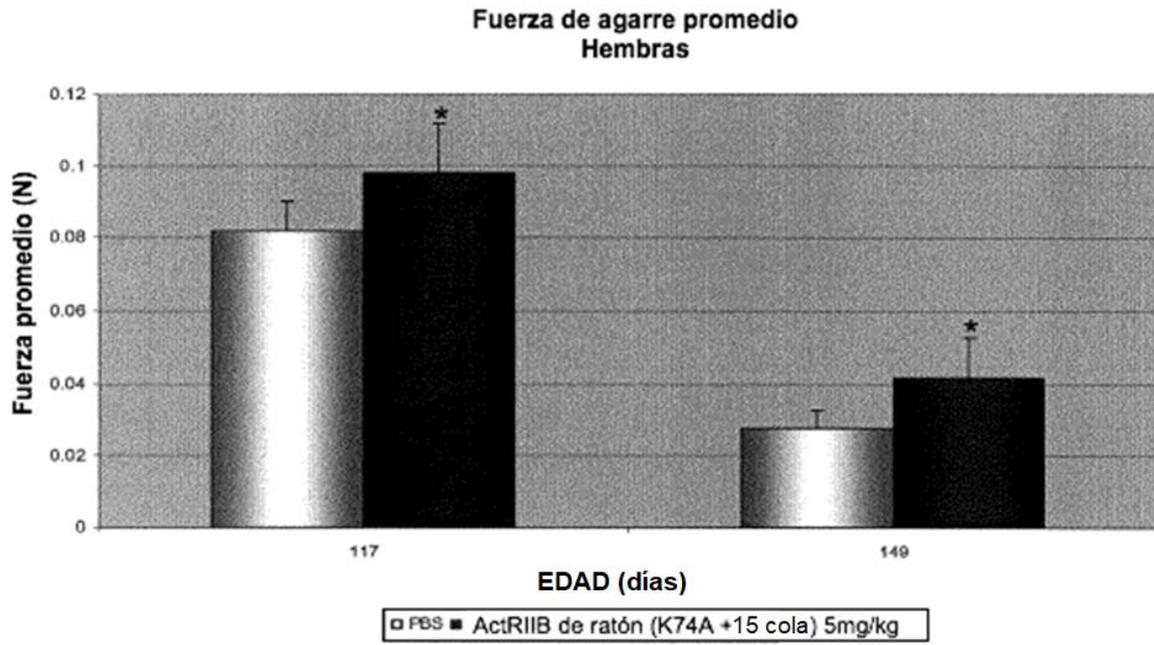


Figura 7

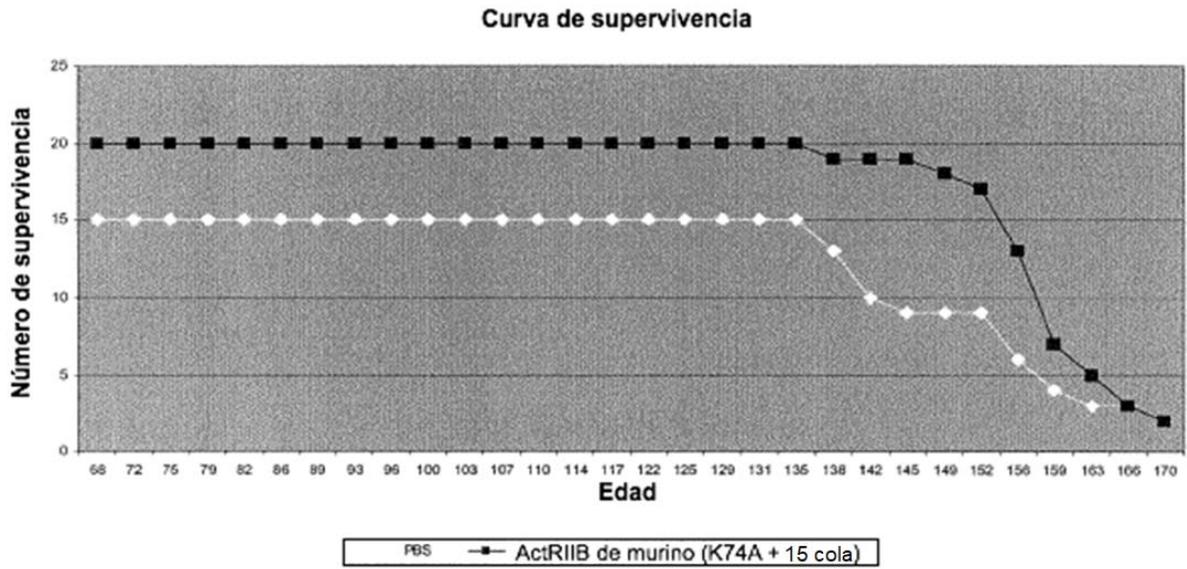


Figura 8

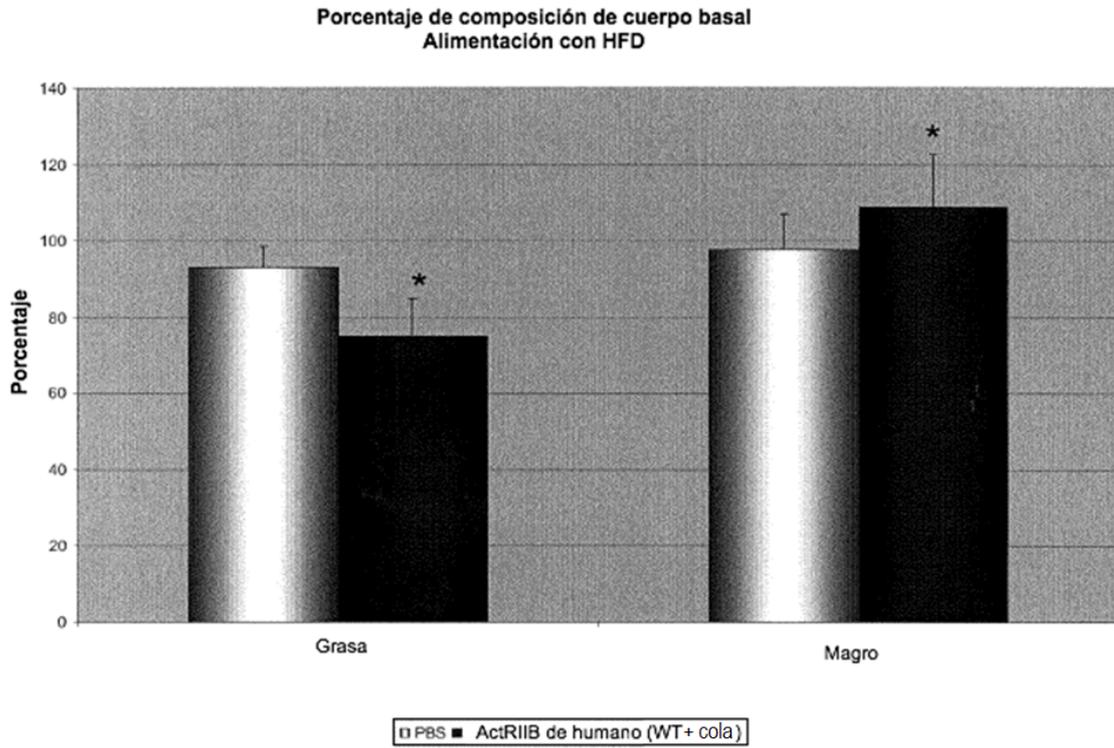


Figura 9

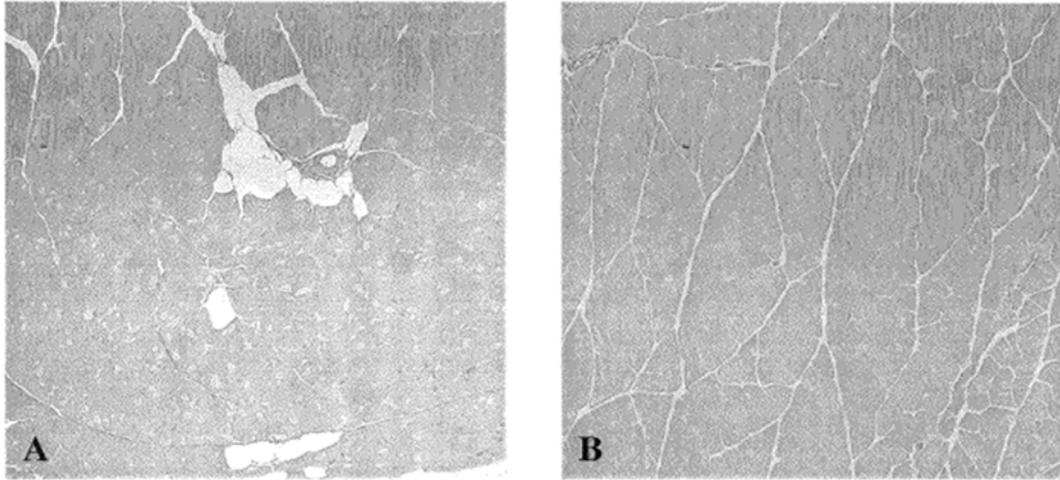


Figura 10

Pesos corporales medios de ratones BALB/c machos implantados con CT26

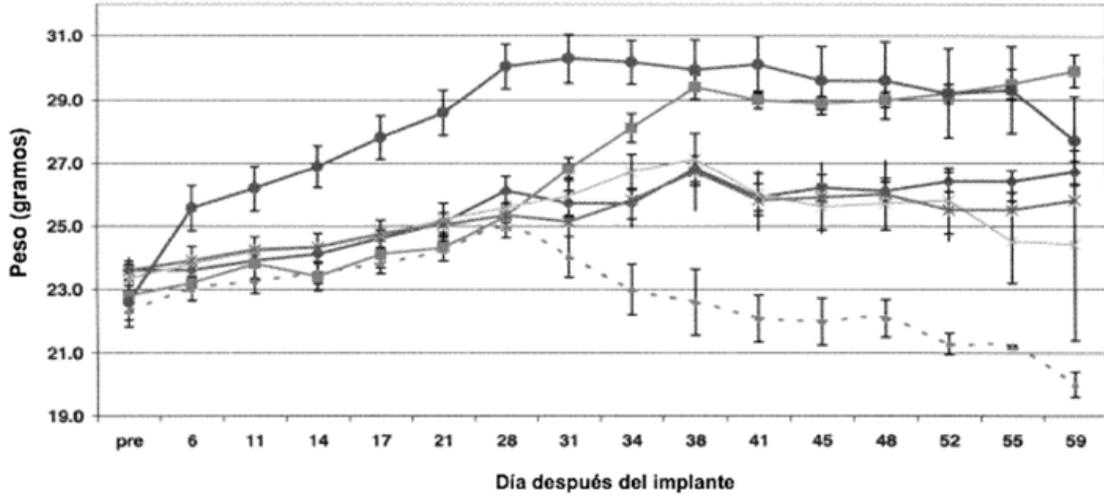


Figura 11

ES 2 796 347 T3

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

IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM  
IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT  
GGPEVTYEPPTAPT

Figura 12

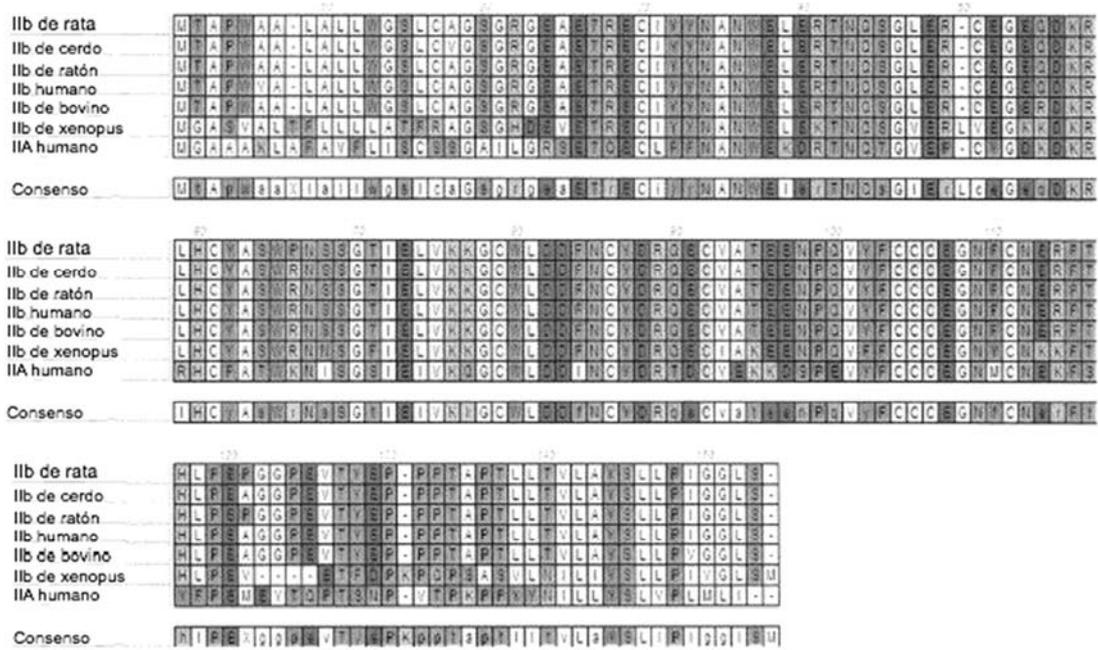


Figura 13