(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 981 471**

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2017 PCT/IB2017/052345**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17187319**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2017 E 17722513 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3448414**

(54) Título: **NOPE para el tratamiento de la pérdida de masa muscular y la debilidad muscular patológicas**

(30) Prioridad:

25.04.2016 US 201662326914 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2024

(73) Titular/es:

FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
111 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

(72) Inventor/es:

HINKEN, AARON CURTIS;
HSU, AMY W.;
POWERS, JANINE;
ROCQUE, WARREN JAMES y
RUSSELL, ALAN JAMES

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

NOPE para el tratamiento de la pérdida de masa muscular y la debilidad muscular patológicas

CAMPO TÉCNICO

Se proporcionan polipéptidos del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de vecino de PuncE11 (NOPE, por sus siglas en inglés) y moléculas de fusión del ECD de NOPE para uso en el tratamiento de la atrofia muscular y otros trastornos. Además, se proporcionan un polinucleótido que codifica una molécula de fusión del ECD de NOPE, un vector que comprende dicho polinucleótido y una célula huésped que comprende dicho vector.

ANTECEDENTES

La pérdida de músculo esquelético y la debilidad física son una característica común de muchas afecciones de desuso, tales como el reposo en cama y el envejecimiento, lesiones neuromusculares, tales como la ELA y lesiones de la médula espinal, y enfermedades crónicas que incluyen el cáncer, la diabetes y la insuficiencia cardíaca. La pérdida de masa muscular disminuye la función física, pero también afecta negativamente el pronóstico del paciente y aumenta la mortalidad (Cohen et al. Nature Rev Drug Disc 2015. 14, 58-74). Por lo tanto, existe una necesidad de terapias eficaces para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades asociadas con disminuciones en cualquiera o una combinación de masa muscular, fuerza muscular y función muscular.

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta, por sus siglas en inglés) contiene una diversidad de factores de crecimiento secretados que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. La miostatina, también conocida como factor de diferenciación del crecimiento (GDF-8), es un miembro de la superfamilia TGF-β y está altamente conservada en los mamíferos. La miostatina se ha caracterizado como un regulador negativo de la masa del músculo esquelético (McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Nature 387(6628):83-90) con inactivación o neutralización genética de la miostatina asociada con un aumento de la masa muscular durante el desarrollo y la edad adulta (Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8 y Lee SJ Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:61-86). Además, los niveles circulantes de miostatina aumentan en muchas condiciones de atrofia muscular (Han HQ, Mitch WE. Curr Opin Support Palliat Care diciembre de 2011; 5(4):334-41 y Elkina et al. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2011; 2:143-151). Enfoques para inhibir la miostatina como estrategia terapéutica en los trastornos de atrofia y debilidad muscular han exhibido potencial con el bloqueo farmacológico que muestra prevención o reversión de la pérdida de masa muscular y prolongación de la vida útil en diversos modelos animales de enfermedades, incluyendo la caquexia por cáncer y la insuficiencia renal (según lo revisado por Curr Opin Drug Discov Devel. julio de 2008; 11(4):487-94 e Int J Biochem Cell Biol. octubre de 2013;45(10):2333-47.). Sin embargo, ninguna terapia actual está aprobada y, por lo tanto, sigue siendo necesaria.

Los polipéptidos NOPE aislados se describen, p. ej., en el documento US 2002/0102551 A1 y se describe que las moléculas de ácido nucleico NOPE pueden utilizarse en una diversidad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas sin mencionar propósito terapéutico específico alguno. Anteriormente se han descrito otras quimeras NOPE-Fc sin describir función alguna ("Recombinant Mouse Nope Fc Chimera"; Fearonetal, Keino Masuetal, Kolodziejetal, Meyerhardt Vielmetteretal; 1 de enero de 2000 (01-01-2000), XP055385761). NOPE es una proteína que se une directamente y neutraliza la miostatina, así como un miembro de la familia GDF11 estrechamente relacionado, y proporciona un enfoque novedoso para aumentar la masa del músculo esquelético. Esto puede ofrecer una terapia eficaz para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades asociadas con la atrofia muscular.

SUMARIO

En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de la atrofia muscular, lesión muscular, un trastorno degenerativo muscular o esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto con desgaste muscular tiene al menos una afección seleccionada de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés), enfermedad renal crónica, enfermedad renal en fase terminal, insuficiencia cardíaca crónica, cáncer, miopatía por enfermedad crítica, polineuropatía por enfermedad crítica, apoplejía, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, leucoencefalopatía multifocal progresiva, encefalomielitis, mielinolisis pontina central, adrenoleucodistrofia, degeneración walleriana, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, leucodistrofia de células globoides y sarcopenia.

En algunas realizaciones, la lesión muscular se selecciona de lesión muscular relacionada con cirugía, lesión muscular traumática, lesión del músculo esquelético relacionada con el trabajo y lesión muscular relacionada con el sobre-entrenamiento.

En algunas realizaciones, el trastorno degenerativo muscular se selecciona de distrofia muscular, distrofia miotónica, polimiositis y dermatomiositis. En algunas realizaciones, el trastorno degenerativo muscular es distrofia muscular. En algunas realizaciones, la distrofia muscular se selecciona de distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita (Fukuyama), distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cinturas

y distrofia muscular facioescapulohumeral. En algunas realizaciones, el trastorno degenerativo muscular es distrofia miotónica. En algunas realizaciones, la distrofia miotónica se selecciona de distrofia miotónica tipo I, distrofia miotónica tipo II y miotonía congénita.

En diversas realizaciones, el tratamiento comprende al menos uno de retrasar la progresión de la atrofia muscular, mejorar la distancia caminada de 6 minutos (6MWD, por sus siglas en inglés) del sujeto, reducir el deterioro físico, retrasar la aparición de eventos que cambian la vida, mejorar la independencia, reducir las hospitalizaciones y retrasar la necesidad de un arreglo de vida asistida. En algunas realizaciones, la 6MWD del sujeto aumenta en al menos 10 metros, o al menos 20 metros, o al menos 30 metros después de 12 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende retrasar la necesidad de una silla de ruedas y/o retrasar la colocación de un ventilador.

En algunas realizaciones, el tratamiento de la ELA comprende al menos uno de retrasar la progresión de la ELA, reducir el deterioro físico, mejorar la capacidad vital forzada, ralentizar la disminución de la capacidad vital forzada, ralentizar la disminución de la puntuación del sujeto en la escala de calificación funcional de la ELA (ALSFRS, por sus siglas en inglés), mejorar la puntuación del sujeto en la ALSFRS, retrasar la ocurrencia de eventos que cambian la vida y mejorar el tiempo de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende retrasar una traqueotomía y/o retrasar la colocación de una gastrostomía endoscópica percutánea (PEG, por sus siglas en inglés).

En diversas realizaciones, la administración del polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE aumenta la masa muscular lenta tipo I y/o disminuye la masa grasa.

En diversas realizaciones, el polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE es una molécula de fusión del ECD de NOPE. En algunas realizaciones, el polipéptido del ECD de NOPE o la molécula de fusión del ECD de NOPE es capaz de unirse a miostatina con una K_D menor que 100 nM. En algunas realizaciones, el polipéptido del ECD de NOPE o la molécula de fusión del ECD de NOPE inhibe la activación de SMAD2/3 mediada por miostatina. En algunas realizaciones, el polipéptido del ECD de NOPE o la molécula de fusión del ECD de NOPE comprende los aminoácidos 25 a 620 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE es una molécula de fusión del ECD de NOPE. En algunas realizaciones, la molécula de fusión del ECD de NOPE comprende un polipéptido del ECD de NOPE y un participante en la fusión. En algunas realizaciones, el participante en la fusión es un Fc. En algunas realizaciones, la molécula de fusión del ECD de NOPE comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de fusión del ECD de NOPE que comprende polipéptido del ECD de NOPE y un participante en la fusión, en donde la molécula de fusión comprende los aminoácidos 26 a 620 de SEQ ID NO: 1 y el participante en la fusión es un Fc.

En aún otro aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica la proteína de fusión del ECD de NOPE de acuerdo con la invención.

En aún otro aspecto, se proporciona un vector que codifica la proteína de fusión del ECD de NOPE de acuerdo con la invención.

En aún otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de fusión del ECD de NOPE de acuerdo con la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 muestra un alineamiento de los dominios extracelulares de NOPE humano y de ratón con la secuencia señal.

FIG. 2 muestra las estructuras de las construcciones de dominio extracelular (ECD)-FC de NOPE utilizadas en los experimentos descritos en esta memoria.

FIG. 3A-D muestran (A, B) el cambio en la masa magra en ratones a los que se les administró ECD-FC de NOPE mediante transfección hidrodinámica de la vena de la cola, (C, D) el cambio en la masa magra en ratones a los que se les administró proteína ECD-FC de NOPE purificada, como se describe en Ejemplo 2. TA = músculo tibial anterior; EDL = músculo extensor largo de los dedos; gastroc = músculo gastrocnemio.

FIG. 4A-E muestran la unión de ECD-FC de NOPE de ratón a miostatina (A) pero no a pro-miostatina (B); unión de ECD-FC de NOPE humano a miostatina (C); y ActR2b-FC, un inhibidor de la miostatina, que se une a la miostatina (D). La constante de asociación, la constante de disociación y la afinidad de cada una de las proteínas por la miostatina se muestran en (E), como se describe en el Ejemplo 3.

FIG. 5 muestra la inhibición de miostatina por construcciones del ECD-FC de NOPE, como se describe en el Ejemplo 4.

FIG. 6 muestra el cambio en la masa magra en ratones a los que se les administraron determinadas construcciones ECD-FC de NOPE mediante transfección hidrodinámica de la vena de la cola, como se describe en el Ejemplo 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los autores de la presente invención han descubierto que NOPE interactúa con miostatina y otros ligandos y que las construcciones de dominio extracelular (ECD)-FC de NOPE aumentan la masa magra en ratones cuando se administran mediante transfección hidrodinámica de la vena de la cola o como una proteína purificada. Por lo tanto, la administración de un NOPE, tal como un ECD de NOPE o variaciones, puede ser un tratamiento eficaz para afecciones que implican lesión muscular y/o atrofia muscular.

Los encabezamientos de las secciones utilizados en esta memoria tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos de la materia objeto.

Definiciones

Salvo que se definan de otro modo, las expresiones y los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que comprenden normalmente los expertos ordinarios en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos y expresiones en singular incluirán pluralidades y los términos y expresiones en plural incluirán el singular.

Técnicas ejemplares utilizadas en relación con ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo y transformación de tejidos (*p. ej.*, electroporación, lipofección), reacciones enzimáticas y técnicas de purificación son conocidas en la técnica. Muchas técnicas y procedimientos de este tipo se describen, *p. ej.*, en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)), entre otros lugares. Además, también se conocen en la técnica técnicas ejemplares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de "o" se refiere a más de una reivindicación independiente o dependiente anterior únicamente como alternativa. A menos que se indique lo contrario, el término "incluyen" tiene el mismo significado que "incluyen, pero no se limita a", el término "incluye" tiene el mismo significado que "incluye, pero no se limita a" y el término "incluyendo" tiene el mismo significado que "incluyendo, pero no limitado a". De manera similar, la expresión "tales como" tiene el mismo significado que la expresión "tales como, pero no limitado a". Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Tal como se utilizan de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos y expresiones, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Las expresiones "**molécula de ácido nucleico**" y "**polinucleótido**" pueden utilizarse indistintamente y se refieren a un polímero de nucleótidos. Polímeros de nucleótidos de este tipo pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales, e incluyen, aunque sin limitación, ADN, ARN y APN. "**Secuencia de ácido nucleico**" se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos que comprende la molécula de ácido nucleico o polinucleótido.

Los términos "**polipéptido**" y "**proteína**" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Polímeros de residuos de aminoácidos de este tipo pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, aunque sin limitación, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. La definición abarca tanto las proteínas de longitud completa como las proteínas variantes. Las expresiones también incluyen modificaciones tras la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adicionales y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR.

Un polipéptido de "**secuencia nativa**" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de origen natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia natural puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por un medio recombinante o sintético. La expresión polipéptido de "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido (p. ej., una secuencia de dominio extracelular), formas variantes que se producen de forma natural (p. ej., formas cortadas y empalmadas alternativamente) y variantes alélicas del polipéptido que se producen de forma natural.

Una "**variante**" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa de SEQ ID NO: 17 después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C del polipéptido. En algunas realizaciones, una variante tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En alguna realización, una variante tendrá al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En alguna realización, una variante tendrá al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. En alguna realización, una variante tendrá al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

Tal como se utiliza en esta memoria, " **Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos**" y "**homología**" con respecto a un péptido, secuencia polipeptídica se definen como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible al público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGNTM (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

La expresión "vecino de punc E11" y el término "**NOPE**" incluyen cualquier NOPE nativo de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (*p. ej.*, seres humanos) y roedores (p. ej., ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término incluye NOPE de longitud completa y sin procesar, así como cualquier forma de NOPE que resulte del procesamiento en la célula o cualquier variante del mismo que conserve la capacidad de unirse específicamente a miostatina con una afinidad (Kd) de menos de ≤ 1 µM, ≤ 100 nM o ≤ 10 nM. El término también abarca variantes que se producen de forma natural de NOPE, *p. ej.*, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. En algunas realizaciones, NOPE es un NOPE humano con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (precursor, con péptido señal) o SEQ ID NO: 2 (madura, sin péptido señal). Un NOPE no humano ejemplar no limitante es el NOPE de ratón con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (precursor, con péptido señal) o SEQ ID NO: 4 (madura, sin péptido señal).

La expresión "**dominio extracelular NOPE**" ("**ECD de NOPE**") incluye ECDs de NOPE de longitud completa y variantes de ECD de NOPE, y se refiere a un polipéptido de NOPE que carece de los dominios intracelular y transmembrana, con o sin un péptido señal. En algunas realizaciones, un ECD de NOPE inhibe la señalización mediada por miostatina. La expresión "**ECD de NOPE de longitud completa**", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un ECD de NOPE que se extiende hasta el último aminoácido del dominio extracelular, y puede incluir o no un péptido señal N-terminal, e incluye variantes de corte y empalme naturales en el dominio extracelular. En algunas realizaciones, un ECD de NOPE humano de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (con péptido señal) o SEQ ID NO: 6 (sin péptido señal). En algunas realizaciones, un ECD de NOPE de ratón de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (con péptido señal) o SEQ ID NO: 12 (sin péptido señal). Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "**variantes de ECD de NOPE**" se refiere a ECDs de NOPE que contienen adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos y que siguen siendo capaces de unirse a miostatina. Variantes de este tipo pueden ser al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas al ECD de NOPE original. El % de identidad de dos polipéptidos se puede medir mediante una puntuación de similitud determinada comparando las secuencias de aminoácidos de los dos polipéptidos utilizando el programa Bestfit con las configuraciones predeterminadas para determinar la similitud. Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981) para encontrar el mejor segmento de similitud entre dos secuencias.

La expresión "**molécula de fusión del ECD de NOPE**" se refiere a una molécula que comprende un ECD de NOPE y uno o más "**participantes en la fusión**". En alguna realización, el ECD de NOPE y el participante en la fusión están enlazados covalentemente ("**condensados**"). Si el participante en la fusión es también un polipéptido ("**el polipéptido participante en la fusión**"), el ECD de NOPE y el polipéptido participante en la fusión pueden ser parte de una secuencia de aminoácidos continua, y el polipéptido participante en la fusión puede estar enlazado al extremo N o el extremo C del ECD de NOPE. En tales casos, el ECD de NOPE y el polipéptido participante en la fusión pueden traducirse como un único polipéptido a partir de una secuencia codificante que codifica tanto el ECD de NOPE como el polipéptido participante en la fusión (la "**proteína de fusión de ECD de NOPE**"). En algunas realizaciones, el ECD de NOPE y el participante en la fusión están enlazados covalentemente a través de otros medios, tales como, por ejemplo, un enlace químico distinto de un enlace peptídico. Se pueden utilizar muchos métodos conocidos para enlazar covalentemente polipéptidos a otras moléculas (por ejemplo, participante en la fusión). En otras realizaciones,

el ECD de NOPE y el participante en la fusión pueden fusionarse a través de un "**enlazador**", que está compuesto por al menos un aminoácido o resto químico.

En algunas realizaciones, el ECD de NOPE y el participante en la fusión están enlazados de forma no covalente. En algunas realizaciones de este tipo, pueden estar enlazados, por ejemplo, utilizando pares de unión. Pares de unión ejemplares incluyen, pero no se limitan a biotina y avidina o estreptavidina, un anticuerpo y su antígeno, *etc.*

Participantes en la fusión ejemplares incluyen, pero no se limitan a un dominio Fc de inmunoglobulina, albúmina y polietilenglicol. Las secuencias de aminoácidos de dominios Fc ejemplares no limitantes se muestran en las SEQ ID NOs: 26 a 28.

En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos de ECD de NOPE se deriva de la de un mamífero no humano. En realizaciones de este tipo, la secuencia de aminoácidos de ECD de NOPE puede derivarse de mamíferos que incluyen, pero no se limitan a roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsteres), conejos, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales mamíferos de laboratorio, animales mamíferos de granja, animales mamíferos deportivos y mascotas mamíferos. Las moléculas de fusión ECD de NOPE que incorporan un ECD de NOPE no humano se denominan "**moléculas de fusión de ECD de NOPE no humanas**". De manera similar a las moléculas de fusión de ECD de NOPE humanas, las moléculas de fusión no humanas pueden comprender un participante en la fusión, un enlazador opcional y un ECD de NOPE. Moléculas de fusión no humanas de este tipo también pueden incluir un péptido señal. Una "**variante de ECD de NOPE no humana**" se refiere a ECDs de NOPE que contienen adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos y que siguen siendo capaces de unirse a miostatina del animal del que se derivó la secuencia.

Los términos "miostatina" y "MSTN" se refieren a miostatina madura, que, en algunas realizaciones de miostatina humana, tiene la secuencia de SEQ ID NO: 20. Una secuencia de miostatina de ratón ejemplar no limitante se muestra en SEQ ID NO: 23. El término "pro-miostatina" se refiere al propéptido de miostatina, con o sin la secuencia señal que, en algunas realizaciones de pro-miostatina humana, tiene la secuencia de SEQ ID NO: 21 (con secuencia señal) o SEQ ID NO: 22 (sin secuencia señal). La pro-miostatina de ratón ejemplar no limitante tiene la secuencia de SEQ ID NO: 24 (con secuencia señal) o SEQ ID NO: 25 (sin secuencia señal).

La expresión "**actividad de miostatina**" o "**actividad biológica**" de miostatina, tal como se utiliza en esta memoria, incluye cualquier efecto biológico de miostatina. En algunas realizaciones, la actividad de miostatina incluye la capacidad de miostatina de activar SMAD2/3. En el Ejemplo 4 se describe un ensayo ejemplar no limitante para determinar la activación de SMAD2/3 por miostatina.

En una realización ejemplar, un **dominio extracelular (ECD)** de NOPE reduce la cantidad de unión detectable de NOPE a miostatina en al menos un 50 %. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE reduce la cantidad de unión detectable de NOPE a miostatina en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 %.

Los términos "**inhibición**" o "**inhibir**" se refieren a una disminución o cese de cualquier característica fenotípica o a la disminución o cese en la incidencia, grado o probabilidad de esa característica. En algunas realizaciones, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución del 20 % o mayor. En otra realización, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución del 50 % o mayor. En otra realización más, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución global de un 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor.

En algunas realizaciones, se considera que un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE "**inhibe la señalización mediada por miostatina**" cuando reduce la activación de SMAD2/3 con una CI50 de menos de 10 nM utilizando, p. ej., el ensayo descrito en el Ejemplo 4 en esta memoria. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE reduce la activación de SMAD2/3 con una CI50 de menos de 5 nM, o menos de 3 nM, o menos de 2 nM, o menos de 1 nM utilizando, p. ej., el ensayo descrito en Ejemplo 4 de esta memoria.

La expresión "**péptido señal**" se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos ubicados en el extremo N de un polipéptido que facilita la secreción de un polipéptido a partir de una célula de mamífero. Un péptido señal puede escindirse tras la exportación del polipéptido de la célula de mamífero, formando una proteína madura. Los péptidos señal pueden ser naturales o sintéticos y pueden ser heterólogos u homólogos de la proteína a la que están fijados. Péptidos señal ejemplares incluyen, pero no se limitan a los péptidos señal de NOPE y miostatina. Péptidos señal ejemplares también incluyen péptidos señal de proteínas heterólogas. Una "**secuencia señal**" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido señal. En algunas realizaciones, un polipéptido del ECD de NOPE o una molécula de fusión del ECD de NOPE carece de un péptido señal. En algunas realizaciones, un polipéptido del ECD NOPE o una molécula de fusión del ECD de NOPE incluye al menos un péptido señal, que puede ser un péptido señal NOPE nativo o un péptido señal heterólogo.

El término "**vector**" se utiliza para describir un polinucleótido que puede ser modificado genéticamente para contener un polinucleótido o polinucleótidos clonados que pueden propagarse en una célula huésped. Un vector puede incluir

uno o más de los siguientes elementos: un origen de replicación, una o más secuencias reguladoras (tales como, por ejemplo, promotores y/o potenciadores) que regulan la expresión del polipéptido de interés, y/o uno o más genes marcadores seleccionables (tales como, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos y genes que pueden utilizarse en ensayos colorimétricos, *p. ej.*, β-galactosidasa). La expresión "**vector de expresión**" se refiere a un vector que se utiliza para expresar un polipéptido de interés en una célula huésped.

Una "**célula huésped**" se refiere a una célula que puede ser o ha sido receptora de un vector o polinucleótido aislado. Las células huésped pueden ser células procarióticas o células eucarióticas. Células eucarióticas ejemplares incluyen células de mamífero, tales como células animales de primate o no de primate; células fúngicas, tales como levaduras; células vegetales; y células de insectos. Células de mamífero ejemplares no limitantes incluyen, aunque sin limitación, células NSO, células PER.C6® (Crucell), y células 293 y CHO, y sus derivados, tales como células 293-6E y DG44, respectivamente.

El término "**aislado**", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que típicamente se encuentra en la naturaleza o que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que típicamente se produce. Por ejemplo, un polipéptido se denomina "aislado" cuando se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en que se produjo. Cuando se secreta un polipéptido mediante una célula después de la expresión, la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produce se considera que es "aislar" el polipéptido. De manera similar, un polinucleótido se denomina "aislado" cuando no forma parte del polinucleótido más grande (tal como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en el que normalmente se encuentra en la naturaleza o se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo, *p. ej.*, en el caso de un polinucleótido de ARN. Por tanto, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula huésped puede denominarse "aislado" siempre que ese polinucleótido no se encuentre en ese vector en la naturaleza.

Los términos "**sujeto**" y "**paciente**" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a un ser humano. En algunas realizaciones, el polipéptido de ECD de NOPE para uso en el tratamiento de otros mamíferos, que incluyen, pero no se limitana roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales mamíferos de laboratorio, animales mamíferos de granja, animales mamíferos deportivos y también se proporcionan mascotas mamíferos. En algunos casos, un "sujeto" o "paciente" se refiere a un sujeto o paciente que necesita tratamiento para una enfermedad o trastorno.

El término "**muestra**" o "**muestra de paciente**", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a material que se ha de obtener o derivar de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se ha de caracterizar y/o identificar, por ejemplo, basado en características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Por ejemplo, la expresión "**muestra de enfermedad**" y variaciones de la misma se refiere a cualquier muestra a obtener de un sujeto de interés que se esperaría o se sabe que contiene la entidad celular y/o molecular que se ha de caracterizar. Por "**muestra de tejido o célula**" se entiende una colección de células similares que se obtienen de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido o célula puede ser tejido sólido procedente de una muestra o biopsia o aspirado de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado (incluyendo, por ejemplo, fluido de lavado broncoalveolar y esputo inducido); sangre o cualquier componente de la sangre; fluidos corporales tales como esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido también puede ser células o líneas celulares primarias o cultivadas. Opcionalmente, la muestra de tejido o célula se ha de obtener de un tejido/órgano enfermo. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se mezclan de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Una "**muestra de referencia**", "**célula de referencia**" o "**tejido de referencia**", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una muestra, célula o tejido a obtener de una fuente que se sabe, o se cree, que no padece la enfermedad o afección para para la cual se está utilizando una composición de la invención. En una realización, se ha de obtener una muestra de referencia, una célula de referencia o un tejido de referencia de una parte sana del cuerpo del mismo sujeto o paciente en quien se está identificando una enfermedad o afección utilizando una composición o un método de la invención. En una realización, se ha de obtener una muestra de referencia, una célula de referencia o un tejido de referencia de una parte sana del cuerpo de al menos un individuo que no es el sujeto o paciente en quien se está identificando una enfermedad o afección utilizando una composición de la invención. En algunas realizaciones, se obtuvo previamente una muestra de referencia, una célula de referencia o un tejido de referencia de un paciente antes de desarrollar una enfermedad o afección o en una fase anterior de la enfermedad o afección.

Una afección "**se ha caracterizado previamente por tener [una característica]**" cuando una característica de este tipo de la afección se ha mostrado en al menos un subconjunto de pacientes con la afección, o en uno o más modelos animales de la afección. En algunas realizaciones, no es necesario determinar una característica de este tipo de la afección en el paciente a tratar con un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE. No es necesario haber determinado la presencia de la característica en un paciente específico que ha de ser tratado utilizando las presentes composiciones para que se considere que el paciente tiene una afección que previamente se ha caracterizado por tener la característica.

Un "**trastorno**" o una "**enfermedad**" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en esta memoria incluyen cánceres, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades neurodegenerativas.

"**Desgaste muscular**", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una disminución en la masa muscular que, en algunas realizaciones, acompaña a una afección que provoca directamente un desgaste muscular y/o da como resultado un movimiento restringido, que puede conducir a desgaste muscular. Afecciones ejemplares no limitantes que pueden estar asociadas con el desgaste muscular incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad renal crónica, enfermedad renal en fase terminal, insuficiencia cardíaca crónica, cáncer, miopatía por enfermedad crítica, polineuropatía por enfermedad crítica, apoplejía, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, leucoencefalopatía multifocal progresiva, encefalomielitis, mielinolisis pontina central, adrenoleucodistrofia, degeneración walleriana, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, leucodistrofia de células globoides y sarcopenia.

"**Trastorno degenerativo muscular**", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un trastorno que perjudica el funcionamiento de los músculos ya sea directamente (p. ej., una patología que afecta al músculo) o indirectamente (p. ej., una patología que afecta a los nervios o las uniones neuromusculares). Trastornos degenerativos musculares ejemplares no limitantes incluyen distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, distrofia miotónica, polimiositis y dermatomiositis.

"**Tratamiento**", tal como se utiliza en esta memoria, cubre cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para una enfermedad (a la que también se alude en esta memoria como "trastorno" o "afección") en un mamífero, incluido un ser humano, e incluye inhibir o ralentizar la enfermedad o su progresión, inhibir o retardar la enfermedad o su progresión, detener su desarrollo, aliviar parcial o totalmente la enfermedad, aliviar parcial o totalmente uno o más síntomas de una enfermedad, o restaurar o reparar una función perdida, que falta o defectuosa; o estimular un proceso ineficiente.

La expresión "**cantidad eficaz**" o "**cantidad terapéuticamente eficaz**" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del polipéptido del dominio extracelular (ECD) de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una "**cantidad profilácticamente eficaz**" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típica, pero no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o en una fase anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Un "**soporte farmacéuticamente aceptable**" se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante, auxiliar de formulación o soporte sólido, semisólido o líquido no tóxico convencional en la técnica para uso con un agente terapéutico que juntos comprenden una "**composición farmacéutica**" para administración. a un sujeto. Un soporte farmacéuticamente aceptable es atóxico para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El soporte farmacéuticamente aceptable es apropiado para la formulación empleada. Por ejemplo, si el agente terapéutico se ha de administrar por vía oral, el soporte puede ser una cápsula de gel. Si el agente terapéutico se ha de administrar por vía subcutánea, lo ideal es que el soporte no sea irritable para la piel y no provoque una reacción en el lugar de la inyección.

Un "**artículo de manufactura**" es cualquier manufactura (p. ej., un envase o recipiente) o kit que comprende al menos un reactivo, *p. ej.,* un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, o una sonda para detectar específicamente un biomarcador descrito en esta memoria. En algunas realizaciones, la manufactura o el kit se promociona, distribuye o vende como una unidad para realizar los usos descritos en esta memoria.

Composiciones y usos terapéuticos

Usos en el Tratamiento de Enfermedades

Se proporcionan polipéptidos del dominio extracelular (ECD) de NOPE (incluyendo las moléculas de fusión de ECD de NOPE) para uso en el tratamiento de seres humanos y otros mamíferos. Se proporcionan polipéptidos del dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de una enfermedad en seres humanos y otros mamíferos.

Métodos para Tratar el Desgaste Muscular

Los autores de la presente invención han encontrado que los polipéptidos de ECD de NOPE y las moléculas de fusión de ECD de NOPE aumentan la masa muscular y potencian la recuperación después de una lesión por aplastamiento del nervio *in vivo.* Además, los autores de la presente invención han demostrado que NOPE se une a miostatina *in vitro,* lo que sugiere que los polipéptidos de ECD de NOPE y las moléculas de fusión de ECD de NOPE pueden estar actuando como una trampa de ligandos de miostatina e inhibiendo la señalización mediada por miostatina *in vivo.*

En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento del desgaste en un sujeto. En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido o molécula de fusión del ECD de NOPE para uso en el tratamiento del desgaste en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección que provoca desgaste muscular. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección que conduce a la inactividad, lo que resulta en desgaste muscular. Afecciones ejemplares no limitantes que pueden estar asociadas con el desgaste muscular incluyen, pero no se limitan a enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad renal crónica, enfermedad renal en fase terminal, insuficiencia cardíaca crónica, cáncer, miopatía por enfermedad crítica, polineuropatía por enfermedad crítica, apoplejía, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, leucoencefalopatía multifocal progresiva, encefalomielitis, mielinolisis pontina central, adrenoleucodistrofia, degeneración walleriana, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, leucodistrofia de células globoides y sarcopenia.

En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de la lesión muscular en un sujeto. En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido del ECD de NOPE o una molécula de fusión del ECD de NOPE para uso en el tratamiento de la lesión muscular en un sujeto. Muchas circunstancias y eventos pueden provocar lesiones musculares, incluyendo, pero no limitadas a lesión muscular relacionada con cirugía, lesión muscular traumática, lesión del músculo esquelético relacionada con el trabajo y lesión muscular relacionada con el sobre-entrenamiento.

Ejemplos no limitantes de lesiones musculares relacionadas con la cirugía incluyen daño muscular debido al reemplazo de rodilla, reparación del ligamento cruzado anterior (ACL, por sus siglas en inglés), cirugía plástica, cirugía de reemplazo de cadera, cirugía de reemplazo de articulaciones, cirugía de reparación de tendones, reparación quirúrgica de enfermedades y lesiones del manguito rotador y amputación.

Ejemplos no limitantes de lesiones musculares traumáticas incluyen lesiones musculares en el campo de batalla, lesiones musculares relacionadas con accidentes automovilísticos y lesiones musculares relacionadas con los deportes. Lesiones traumáticas del músculo pueden incluir laceraciones, contusiones por fuerza contundente, heridas de metralla, tirones o desgarros musculares, quemaduras, distensiones agudas, distensiones crónicas, lesiones por estrés por peso o fuerza, lesiones por estrés repetitivo, lesión muscular por avulsión y síndrome compartimental.

En algunas realizaciones, la lesión muscular es una lesión muscular traumática y el método de tratamiento proporciona la administración de al menos una dosis alta de un compuesto de la invención inmediatamente después de la lesión traumática (por ejemplo, en el espacio de un día de la lesión) seguida de la administración periódica de una dosis baja de un compuesto de la invención durante el período de recuperación.

Ejemplos no limitantes de lesiones musculares relacionadas con el trabajo incluyen lesiones provocadas por movimientos altamente repetitivos, movimientos contundentes, posturas incómodas, acoplamiento mecánico prolongado y contundente entre el cuerpo y un objeto, y vibración. Las lesiones musculares relacionadas con el sobre-entrenamiento incluyen daños musculares no reparados o insuficientemente reparados que coinciden con una falta de recuperación o falta de aumento de la capacidad de trabajo físico. En una realización adicional, la lesión muscular es daño muscular inducido por ejercicio o deportes que incluye dolor muscular de aparición retardada (DOMS, por sus siglas en inglés) inducido por ejercicio.

En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento del trastorno degenerativo muscular en un sujeto. En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido de ECD de NOPE o una molécula de fusión del ECD de NOPE para uso en el tratamiento del trastorno degenerativo en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto con el trastorno degenerativo muscular ha experimentado desgaste muscular. En algunas realizaciones, al sujeto con el trastorno degenerativo muscular se le ha diagnosticado el trastorno, pero aún no ha experimentado un desgaste muscular significativo o detectable. Trastornos degenerativos musculares ejemplares no limitantes incluyen, pero no se limitan a distrofia muscular, distrofia miotónica, polimiositis y dermatomiositis. Trastornos degenerativos musculares ejemplares no limitantes incluyen, pero no se limitan a distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita (Fukuyama), distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cintura y distrofia muscular facioescapulohumeral. Distrofias miotónicas ejemplares no limitativas incluyen, pero no se limitana a distrofia miotónica tipo I, distrofia miotónica tipo II y miotonía congénita.

En algunas realizaciones, el tratamiento del desgaste muscular, una lesión muscular o un trastorno degenerativo muscular comprende al menos uno de: retrasar la progresión del desgaste muscular, mejorar la distancia caminada de 6 minutos (6MWD) del sujeto, reducir el deterioro físico, retrasar la aparición de eventos que cambian la vida, mejorar la independencia, reducir las hospitalizaciones y retrasar la necesidad de un sistema de vida asistida En algunas realizaciones, mejorar la distancia caminada de 6 minutos (6MWD) del sujeto significa que la 6MWD del sujeto ha aumentado en al menos 10 metros, o al menos 20 metros, o al menos 30 metros después de 12 meses de tratamiento. En otra realización, la preservación de una 6MWD de un sujeto indicaría una buena eficacia en algunos trastornos (p. ej., distrofia muscular de Duchenne). Eventos ejemplares no limitantes que cambian la vida incluyen ser conectado a un ventilador y/o necesitar una silla de ruedas.

En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) en un sujeto. En algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido del ECD de NOPE o una molécula de fusión del ECD de NOPE para uso en el tratamiento de la ALS en un sujeto. En algunas realizaciones, se considera un tratamiento de la ELA cuando resulta en al menos uno de: retrasar la progresión de la ELA, reducir el deterioro físico, mejorar la capacidad vital forzada, ralentizar la disminución de la capacidad vital forzada, ralentizar la disminución de la puntuación del sujeto en la escala de calificación funcional de la ELA (ALSFRS), mejorar la puntuación del sujeto en la ALSFRS, retrasar la ocurrencia de eventos que cambian la vida y mejorar el tiempo de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, se considera un tratamiento de la ELA cuando resulta en retrasar una traqueotomía y/o retrasar la colocación de una gastrostomía endoscópica percutánea (PEG).

Vías de Administración y Soportes

En diversas realizaciones, los agonistas de NOPE se pueden administrar por vía subcutánea o intravenosa. En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio extracelular (ECD) NOPE se puede administrar *in vivo* mediante diversas vías, que incluyen, pero no se limitan a oral, intra-arterial, parenteral, intranasal, intramuscular, intracardíaca, intraventricular, intratraqueal, bucal, rectal, intraperitoneal, por inhalación, intradérmica, tópica, transdérmica e intratecal, o de otro modo, *p. ej.*, mediante implantación. Las presente composiciones pueden formularse en preparaciones en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa; incluyendo, aunque sin limitación, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, enemas, inyecciones, inhalantes y aerosoles. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se suministra mediante terapia génica. Como ejemplo no limitante, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE puede recubrirse sobre micropartículas de oro y suministrarse por vía intradérmica mediante un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola génica", *p. ej.*, como se describe en la bibliografía (*véase*, *p. ej.*, Tang et al., Nature 356:152-154 (1992)).

En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE (tal como la molécula de fusión del ECD de NOPE) se proporcionan en formulaciones con una amplia diversidad de soportes farmacéuticamente aceptables (*véase*, *p. ej.*, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20ª ed. (2003); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippencott Williams y Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª ed., Pharmaceutical Press (2000)). Están disponibles diversos soportes farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes. Además, también están disponibles diversas sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares. Soportes ejemplares no limitantes incluyen solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se pueden formular para inyección, incluyendo la administración subcutánea, disolviéndolas, suspendiéndolas o emulsionándolas en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes. En diversas realizaciones, las composiciones pueden formularse para inhalación, por ejemplo, usando propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Las composiciones también pueden formularse, en diversas realizaciones, en microcápsulas de liberación mantenida, tal como con polímeros biodegradables o no biodegradables. Una formulación biodegradable ejemplar no limitante incluye polímero de ácido poliláctico-ácido glicólico. Una formulación no biodegradable ejemplar no limitante incluye un éster de ácido graso de poliglicerol. Determinados métodos de generación de formulaciones de este tipo se describen, por ejemplo, en el documento EP 1 125 584 A1.

También se proporcionan envases de dosificación farmacéutica que comprenden uno o más recipientes, cada uno de los cuales contiene una o más dosis de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE. En algunas realizaciones, se proporciona una dosificación unitaria en la que la dosificación unitaria contiene una cantidad predeterminada de una composición que comprende un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE, con o sin uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, una dosificación unitaria de este tipo se suministra en una jeringa prellenada de un solo uso para inyección. En diversas realizaciones, la composición contenida en la

dosificación unitaria puede comprender solución salina, sacarosa o similares; un tampón, tal como fosfato, o similares; y/o formularse dentro de un intervalo de pH estable y eficaz. Como alternativa, en algunas realizaciones, la composición puede proporcionarse como un polvo liofilizado que puede reconstituirse tras la adición de un líquido apropiado, por ejemplo, agua estéril. En algunas realizaciones, la composición comprende una o más sustancias que inhiben la agregación de proteínas incluyendo, aunque sin limitación, sacarosa y arginina. En algunas realizaciones, una composición de la invención comprende heparina y/o un proteoglicano.

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento o la profilaxis de la indicación específica. La cantidad terapéuticamente eficaz depende típicamente del peso del sujeto que se esté tratando, su estado físico o de salud, la extensión de la afección a tratar o la edad del sujeto que se esté tratando. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis.

En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg por dosis. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 500 mg por dosis. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg por dosis. En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg por dosis.

Las composiciones de polipéptidos del dominio extracelular (ECD) de NOPE pueden administrarse según sea necesario a los sujetos. En algunas realizaciones, se ha de administrar a un sujeto una dosis eficaz de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE una o más veces. En diversas realizaciones, se debe administrar al sujeto una dosis eficaz de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE una vez al mes, menos de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada dos meses, cada tres meses o cada seis meses. En otras realizaciones, se debe administrar una dosis eficaz de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE más de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada dos semanas, cada semana, dos veces por a la semana, tres veces a la semana, diariamente, o múltiples veces al día. Se debe administrar al sujeto al menos una dosis eficaz de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar múltiples veces, incluyendo períodos de al menos un mes, al menos seis meses o al menos un año. En algunas realizaciones, se debe administrar un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE a un sujeto según sea necesario para aliviar uno o más síntomas de una afección.

Terapia de Combinación

Un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE de acuerdo con la invención, incluyendo cualquier variante funcional del mismo, puede administrarse a un sujeto que lo necesite en combinación con otras sustancias biológicamente activas u otros procedimientos de tratamiento para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, el polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se puede administrar solo o con otros modos de tratamiento. Pueden proporcionarse antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de otros modos de tratamiento.

En algunas realizaciones, un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE se ha de administrar a un sujeto antes, durante o después de otro modo de tratamiento, tal como ejercicio y/o fisioterapia o cirugía.

Un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de determinadas distrofias musculares, tales como la distrofia muscular de Duchenne, puede comprender, además, la administración de un corticosteroide. Un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de determinadas distrofias miotónicas puede comprender, además, la administración de un agente terapéutico seleccionado de fenitoína, procainamida y quinina. Un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) puede comprender, además, la administración de riluzol.

Dominios Extracelulares (ECDs) de NOPE

ECDs de NOPE ejemplares no limitativos incluyen ECDs de NOPE de longitud completa y variantes de ECD de NOPE. Los ECDs de NOPE se unen a miostatina. En algunas realizaciones, un ECD de NOPE inhibe la activación de SMAD2/3 mediada por miostatina. Los ECDs de NOPE pueden incluir o carecer de un péptido señal. ECDs de NOPE

ejemplares incluyen, pero no se limitana a ECDs de NOPE humanos que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NOs: 5 (con péptido señal) y 6 (sin péptido señal) y SEQ ID NO: 8.

Variantes de ECD de NOPE incluyen variantes que comprenden una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, y que siguen siendo capaces de unirse a miostatina. En algunas realizaciones, una secuencia variante del ECD de NOPE es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia correspondiente del ECD de NOPE original.

Participantes en la Fusión y Conjugados

En algunas realizaciones, un ECD de NOPE de la presente invención se puede combinar con un polipéptido participante en la fusión, lo que da como resultado una proteína de fusión. Estos polipéptidos participantes en la fusión pueden facilitar la purificación y pueden mostrar una semivida incrementada *in vivo.* Los polipéptidos participantes en la fusión que tienen una estructura dimérica enlazada por disulfuro debido a la porción IgG también pueden ser más eficaces para unir y neutralizar otras moléculas que la proteína de fusión monomérica ECD de NOPE o la ECD de NOPE sola. Otros participantes en la fusión adecuados para los ECD de NOPE incluyen, por ejemplo, polímeros, tales como polímeros hidrosolubles, el dominio constante de las inmunoglobulinas; toda o parte de la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés); fetuina A; fetuina B; un dominio de cremallera de leucina; un dominio de trimerización de tetranectina; proteína de unión a manosa (también conocida como lectina de unión a manosa), por ejemplo, proteína de unión a manosa 1; y una región Fc, como se describe en esta memoria y se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. Nº 6.686.179.

Se puede preparar una molécula de fusión fijando poliaminoácidos o aminoácidos de punto de ramificación al ECD de NOPE. Por ejemplo, el poliaminoácido puede ser una proteína portadora que sirve para aumentar la semivida en circulación del ECD de NOPE (además de las ventajas conseguidas mediante una molécula de fusión). Para el propósito terapéutico de la presente invención, poliaminoácidos de este tipo deberían ser, idealmente, aquellos que no creen una respuesta antigénica neutralizante u otras respuestas adversas. Poliaminoácidos de este tipo se pueden elegir de albúmina sérica (tal como HSA), fetuina A, fetuina B, derivado eritroide del factor nuclear de cremallera de leucina-2 (NFE2), cremallera de leucina neurorretiniana, tetranectina u otros poliaminoácidos, por ejemplo, lisinas. Como se describe en esta memoria, la ubicación de fijación del poliaminoácido puede ser en el extremo N o el extremo C, u otros lugares intermedios, y también puede estar conectado mediante un resto enlazador químico a la molécula seleccionada.

Polímeros

Polímeros, por ejemplo, polímeros hidrosolubles, pueden ser útiles en la presente invención para reducir la precipitación del ECD de NOPE al que está fijado el polímero en un entorno acuoso, tal como el que se encuentra típicamente en un entorno fisiológico. Los polímeros empleados en la invención serán farmacéuticamente aceptables para la preparación de un producto o composición terapéutico.

Polímeros hidrosolubles adecuados y clínicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), propionaldehído de polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli(β-aminoácidos) (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (POG) (p. ej., glicerol) y otros polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado o glucosa polioxietilada, ácidos colónicos u otros polímeros de hidratos de carbono, Ficoll, o dextrano y mezclas de los mismos.

Los polímeros utilizados en esta memoria, por ejemplo polímeros hidrosolubles, pueden tener cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o no ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular promedio de entre 2 kDa y 100 kDa, entre 5 kDa y 50 kDa, o entre 12 kDa y 25 kDa. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular o cuantas más ramificaciones, mayor será la relación polímero:proteína. También se pueden utilizar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado; por ejemplo, la duración de la liberación sostenida; los efectos, en su caso, sobre la actividad biológica; la facilidad de manipulación; el grado o la falta de antigenicidad; y otros efectos conocidos de un polímero en un ECD de NOPE de la invención.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla el ECD de NOPE derivatizado químicamente para incluir restos mono o poli (*p. ej.*, 2-4) PEG. La pegilación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las reacciones de pegilación disponibles. Existe un cierto número de métodos de fijación de PEG disponibles para los expertos en la técnica. *Véanse,* por ejemplo, los documentos EP 0 401 384; Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992); Francis, Focus on Growth Factors, 3(2):4-10 (1992); documentos EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; Chamow, Bioconjugate Chem., 5:133-140 (1994); Pat. de EE.UU. Nº 5.252.714; y las otras publicaciones citadas en esta memoria que se relacionan con la pegilación.

Marcadores

Los ECDs de NOPE de la presente invención pueden condensarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido que facilita la purificación del polipéptido condensado. La secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa-histidina tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta peptídica útil para la purificación, la etiqueta de hemaglutinina (HA), corresponde a un epítopo derivado de la proteína HA de la influenza. (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)). Cualquiera de estas fusiones anteriores se puede modificar genéticamente utilizando el ECD de NOPE de la presente invención.

Participantes en la Fusión de Dominios de Oligomerización

En diversas realizaciones, la oligomerización ofrece algunas ventajas funcionales a una proteína de fusión, que incluyen, pero no se limitan a multivalencia, fuerza de unión incrementada y la función combinada de diferentes dominios. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un participante en la fusión comprende un dominio de oligomerización, por ejemplo, un dominio de dimerización. Dominios de oligomerización ejemplares incluyen, pero no se limitan a dominios enrollados en espiral, incluyendo dominios enrollados en espiral alfa; dominios de colágeno; dominios similares a colágeno; y determinados dominios de inmunoglobulina. Participantes en la fusión de polipéptidos enrollados en espiral ejemplares incluyen, pero no se limitan al dominio enrollado en espiral de tetranectina; el dominio enrollado en espiral de la proteína de la matriz oligomérica del cartílago; dominios enrollados en espiral de angiopoyetina; y dominios de cremallera de leucina. Dominios de oligomerización de colágeno o de tipo colágeno ejemplares incluyen, pero no se limitan a los que se encuentran en colágenos, lectina de unión a manosa, proteínas A y D de tensioactivo pulmonar, adiponectina, ficolina, conglutinina, receptor eliminador de macrófagos y emilina.

Participantes en la Fusión del Dominio Fc del Anticuerpo Inmunoglobulina

En la técnica se conocen muchos dominios Fc que pueden utilizarse como participantes en la fusión. En algunas realizaciones, un participante en la fusión es un dominio Fc de inmunoglobulina. Un participante en la fusión de Fc puede ser un Fc de tipo salvaje que se encuentra en un anticuerpo que se produce de forma natural, o una variante del mismo. Participantes en la fusión de Fc ejemplares no limitantes incluyen Fc que comprenden una bisagra y los dominios constantes CH2 y CH3 de una IgG humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, un participante en la fusión de Fc comprende una mutación C237S, por ejemplo, en una región constante de IgG1. *Véase, p. ej.*, SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, un participante en la fusión de Fc es una región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones de este tipo, la región constante de IgG4 humana comprende una mutación S241P. *Véase, p. ej.*, Angal et al. Mol. Immunol. 30(1): 105-108 (1993). En algunas realizaciones, un participante en la fusión de Fc comprende dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG2 humana con una mutación P331S, como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.900.292. Participantes en la fusión de Fc ejemplares también incluyen, pero no se limitan a IgA e IgM humanas. Determinados participantes en la fusión del dominio Fc ejemplares se muestran en las SEQ ID NOs: 26 a 28.

En algunas realizaciones, la función efectora no es deseable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la función efectora puede no ser deseable en tratamientos de afecciones inflamatorias y/o trastornos autoinmunes. En algunas realizaciones de este tipo, se selecciona o modifica genéticamente una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 comprende una mutación S241P.

Participantes en la Fusión de Albúmina y Participantes en la Fusión de Moléculas de Unión a Albúmina

En algunas realizaciones, un participante en la fusión es una albúmina. Albúminas ejemplares incluyen, pero no se limitan a albúmina sérica humana (HSA) y fragmentos de HSA que son capaces de aumentar la semivida sérica o la biodisponibilidad del polipéptido al que están condensados. En algunas realizaciones, un participante en la fusión es una molécula de unión a albúmina, tal como, por ejemplo, un péptido que se une a albúmina o una molécula que se conjuga con un lípido u otra molécula que se une a albúmina. En algunas realizaciones, se prepara una molécula de fusión que comprende HSA como se describe, *p. ej.*, en la Patente de EE.UU. Nº 6.686.179.

Fijación Ejemplar de los Participantes en la Fusión

El participante en la fusión puede estar fijado, ya sea de forma covalente o no covalente, al extremo N o al extremo C del ECD de NOPE. La fijación también puede ocurrir en una ubicación dentro del ECD de NOPE distinta del extremo N o del extremo C, por ejemplo, a través de una cadena lateral de aminoácido (tal como, por ejemplo, la cadena lateral de cisteína, lisina, serina o treonina).

En realizaciones de fijación covalente o no covalente, se puede incluir un enlazador entre el participante en la fusión y el ECD de NOPE. Enlazadores de este tipo pueden estar compuestos por al menos un aminoácido o resto químico. Métodos ejemplares de fijar covalentemente un participante en la fusión a un ECD de NOPE incluyen, pero no se limitan a la traducción del participante en la fusión y el ECD de NOPE como una única secuencia de aminoácidos y la

fijación química del participante en la fusión al ECD de NOPE. Cuando el participante en la fusión y el ECD de NOPE se traducen como una secuencia de aminoácidos única, se pueden incluir aminoácidos adicionales entre el participante en la fusión y el ECD de NOPE como un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador se selecciona basándose en la secuencia de polinucleótidos que lo codifica, para facilitar la clonación del participante en la fusión y/o ECD de NOPE en una única construcción de expresión (por ejemplo, un polinucleótido que contiene un sitio de restricción particular puede colocarse entre el polinucleótido que codifica el participante en la fusión y el polinucleótido que codifica el ECD de NOPE, en donde el polinucleótido que contiene el sitio de restricción codifica una secuencia de enlazador de aminoácidos corta). Cuando el participante en la fusión y el ECD de NOPE se acoplan de forma covalente por medios químicos, típicamente se pueden incluir enlazadores de diversos tamaños durante la reacción de acoplamiento.

Métodos ejemplares de fijación no covalente de un participante en la fusión a un ECD de NOPE incluyen, pero no se limitan a la fijación a través de un par de unión. Pares de unión ejemplares incluyen, pero no se limitan a biotina y avidina o estreptavidina, un anticuerpo y su antígeno, *etc.*

Propiedades Ejemplares de ECDs de NOPE y Moléculas de Fusión del ECD de NOPE

En algunas realizaciones, un ECD de NOPE o una molécula de fusión del ECD de NOPE se une a miostatina e inhibe la activación de SMAD2/3 mediada por miostatina. En algunas realizaciones, la molécula de fusión del ECD de NOPE se une a miostatina con una afinidad de unión (K_D) de menos de 50 nM, menos de 20 nM, menos de 10 nM, menos de 1 nM o menos de 0,1 nM. En algunas realizaciones, una molécula de fusión del ECD de NOPE bloquea la unión de miostatina a NOPE nativo.

Péptidos Señal

Con el fin de que algunas proteínas secretadas se expresen y secreten en grandes cantidades, puede ser deseable un péptido señal de una proteína heteróloga. El empleo de péptidos señal heterólogos puede ser ventajoso porque un polipéptido maduro resultante puede permanecer inalterado a medida que el péptido señal se elimina en el RE durante el proceso de secreción. Se puede requerir la adición de un péptido señal heterólogo para expresar y secretar algunas proteínas.

Se describen secuencias de péptidos señal ejemplares no limitantes, p. ej., en la Base de Datos de Péptidos Señal en línea mantenida por el Departamento de Bioquímica de la Universidad Nacional de Singapur. *Véase* Choo et al., BMC Bioinformatics, 6: 249 (2005); y publicación PCT n.º WO 2006/081430.

Modificaciones Co-Traduccionales y Post-Traduccionales

En algunas realizaciones, un polipéptido tal como un ECD de NOPE se modifica diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo mediante glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica o enlace a una molécula de anticuerpo. u otro ligando celular. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8; $NABH_4$;acetilación; formilación; oxidación; reducción; y/o síntesis metabólica en presencia de tunicamicina.

Modificaciones post-traduccionales adicionales abarcadas por la invención incluyen, por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono enlazadas por N o enlazadas por O; procesamiento de extremos N-terminal o C-terminal; fijación de restos químicos a la cadena principal de aminoácidos; modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono enlazadas por N o enlazadas por O; y adición o deleción de un residuo de metionina N-terminal como resultado de la expresión de una célula huésped procariótica.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican el polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE

En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican moléculas de fusión del ECD de NOPE. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican moléculas de fusión del ECD de NOPE en las que el ECD de NOPE y el participante en la fusión se traducen como un único polipéptido.

En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica un ECD de NOPE comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que, cuando se traduce, se condensará al extremo N del ECD de NOPE. Como se comentó anteriormente, el péptido señal puede ser el péptido señal NOPE nativo o puede ser otro péptido señal heterólogo. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que comprende el polinucleótido que codifica el gen de interés es un vector de expresión que es adecuado para la expresión en una célula huésped seleccionada.

Pueden construirse moléculas de ácido nucleico utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales en la técnica. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico es un vector de expresión que es adecuado para su expresión en una célula huésped seleccionada.

Vectores de Expresión y Producción de Polipéptidos

Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican moléculas de fusión del ECD de NOPE. Vectores de este tipo incluyen, pero no se limitan a vectores de ADN, vectores de fagos, vectores virales, vectores retrovirales, *etc.*

En algunas realizaciones, se selecciona un vector que está optimizado para la expresión de polipéptidos en células CHO o derivadas de CHO, o en células NSO. Vectores ejemplares de este tipo se describen, *p. ej.*, en Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20: 880-889 (2004).

En algunas realizaciones, se elige un vector para la expresión *in vivo* de un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE en animales, incluyendo seres humanos. En algunas realizaciones de este tipo, la expresión del polipéptido o polipéptidos está bajo el control de un promotor o promotores que funcionan de una manera específica para el tejido. Por ejemplo, promotores específicos para el hígado se describen, *p. ej.*, en la Publicación PCT Nº WO 2006/076288.

Células huésped

En diversas realizaciones, los ECDs de NOPE y/o las moléculas de fusión que comprenden cualquiera de ellos pueden expresarse en células procarióticas, tales como células bacterianas; o en células eucarióticas, tales como células fúngicas, células vegetales, células de insectos y células de mamíferos. Una expresión de este tipo puede realizarse, por ejemplo, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Células eucarióticas ejemplares que pueden utilizarse para expresar polipéptidos incluyen, pero no se limitan a células COS, incluyendo células COS 7; células 293, incluyendo células 293-6E; células CHO, incluyendo células CHO-S y DG44; células PER.C6® (Crucell); y células NSO. En algunas realizaciones, se selecciona una célula huésped eucariótica particular en base a su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales deseadas en las ECDs de NOPE y/o moléculas de fusión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células CHO producen polipéptidos que tienen un mayor nivel de sialilación que el mismo polipéptido producido en células 293.

La introducción de uno o más ácidos nucleicos en una célula huésped deseada se puede lograr mediante cualquier método, incluyendo, pero no limitados a transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, *etc.* Métodos ejemplares no limitantes se describen, *p. ej.*, en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Los ácidos nucleicos pueden transfectarse de forma transitoria o estable en las células huésped deseadas, de acuerdo con cualquier método adecuado.

En algunas realizaciones, se pueden producir uno o más polipéptidos *in vivo* en un animal que ha sido modificado genéticamente o transfectado con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, de acuerdo con cualquier método adecuado.

Purificación de Polipéptidos

Los ECDs de NOPE y las moléculas de fusión que comprenden cualquiera de ellos pueden purificarse mediante cualquier método adecuado. Métodos de este tipo incluyen, aunque sin limitación, el uso de matrices de afinidad o cromatografía de interacción hidrófoba. Ligandos de afinidad adecuados incluyen cualquier ligando que se una a NOPE (tal como miostatina) o que se una al participante en la fusión. Además, se puede utilizar una columna de Proteína A, Proteína G, Proteína A/G o una columna de afinidad de anticuerpos para unirse a un participante en la fusión de Fc para purificar una molécula de fusión.

En algunas realizaciones, también se utiliza cromatografía interactiva hidrófoba, por ejemplo, una columna de butilo o fenilo, para purificar algunos polipéptidos. Muchos métodos de purificación de polipéptidos son conocidos en la técnica.

Artículos de Manufactura

En esta memoria se describe un artículo de manufactura o un kit que contiene materiales útiles para la detección de un biomarcador (*p. ej.*, NOPE o miostatina) o para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos arriba descritos. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con él. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, *etc.* Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunas realizaciones, el recipiente contiene una composición que es eficaz por sí sola o combinada con otra composición para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una lumbrera de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial). con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el

prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. En algunas realizaciones, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente terapéutico adicional. El artículo de manufactura puede comprender, además, un prospecto que indique que las composiciones se pueden utilizar para tratar una afección particular. Alternativa, o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender, además, un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir, además, otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En algunas realizaciones, las moléculas de la presente invención se pueden envasar solas o en combinación con otros compuestos terapéuticos en forma de un kit. En una realización, el compuesto terapéutico es un agente anticancerígeno. En otra realización, el compuesto terapéutico es un agente inmunosupresor. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a los pacientes, tales como viales para reconstituir formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV personalizados, inhaladores, *etc.* Adicionalmente, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación. y administración de las composiciones. El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de uso único para un paciente, usos múltiples para un paciente particular (a una dosis constante o en la que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que avanza la terapia); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("envase a granel"). Los componentes del kit pueden ensamblarse en cajas de cartón, blísters, botellas, tubos y similares.

EJEMPLOS

Los ejemplos comentados a continuación están destinados a ser simplemente ejemplares de la invención y no debe considerarse que limiten la invención de modo alguno. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos siguientes sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, *etc.*), pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados Centígrados y la presión es atmosférica o próxima a la atmosférica.

Ejemplo 1: Construcción, expresión y purificación de determinadas proteínas de fusión del ECD de NOPE

Construcciones que codifican las moléculas de fusión del dominio extracelular (ECD)-Fc de NOPE humano (Gen ID 57722) y NOPE de ratón (Gen ID 56741) se clonaron y expresaron a partir del vector pTT5 (Biotechnology Research Institute, Montreal, Canadá). Se construyeron derivados truncados de la molécula de fusión del ECD-Fc de NOPE humana o de ratón utilizando la PCR y técnicas de mutagénesis convencionales. En la Figura 1 se muestran la secuencia de proteína primaria y la estructura de dominio del resto ECD-Fc de NOPE humano y de ratón en la construcción parental. Se crearon derivados ECD-Fc de NOPE truncados para definir dominios importantes para la función de NOPE. La Figura 2 enumera las diversas proteínas de fusión NOPE-Fc utilizadas en estos ejemplos con nombres y breves descripciones.

Para experimentos de confirmación in vivo (p. ej., Ejemplo 2), se clonó ECD-Fc de mNOPE (23-956) que contenía una secuencia señal CD33 humana en lugar de la secuencia señal nativa en un vector Bacmam para la expresión secretada en células CHO o HEK mediante tecnología Bacmam. La proteína secretada se purificó utilizando afinidad por MabSelectSure Protein A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño Superdex-200. Para experimentos de unión in vitro (Ejemplo 3), la producción de ECD-Fc de NOPE y sus derivados se logró mediante transfección transitoria mediada por PEI de células CHO-3E7 cultivadas en CD DG44 (Invitrogen, Grand Island, NY). Las proteínas secretadas se purificaron en una columna HiTrap Protein A (GE Healthcare, Pittsburg, PA).

Ejemplo 2: NOPE aumenta la masa muscular *in vivo*

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si la inyección hidrodinámica en la vena de la cola de un vector de ADN que codifica ECD-FC de mNOPE (1-955) tiene un impacto en el crecimiento muscular in vivo. Se asignaron aleatoriamente ratones BalbC hembra (Charles River Labs, Wilmington, MA) a 2 grupos de tratamiento de 10 ratones cada uno. El día 0, los ratones fueron sometidos a un análisis de masa magra (EchoMRI®, Houston, TX) para establecer mediciones iniciales. Una vez que se registraron las mediciones iniciales, los ratones se transfectaron hidrodinámicamente con ECD-FC de mNOPE (1-955) o control de Vehículo. Los días 7, 21, 27 se midió la masa magra. La exposición a ECD-FC de mNOPE (1-955) demostró efectos anabólicos en la masa magra en el espacio de los 7 días posteriores a la dosificación (Figura 3A). El aumento de masa magra persistió durante todo el estudio. Después de 27 días, se recogieron y pesaron los órganos de masa magra para confirmar que el aumento de masa magra era específico para el músculo. El anabolismo de la masa magra se tradujo en un aumento significativo del músculo esquelético en animales expuestos a ECD-FC de mNOPE (1-955); sin embargo, el hígado, un órgano magro no muscular, no se vio afectado (Figura 3B).

Los autores de la invención confirmaron estos hallazgos con proteína purificada. Se construyó ECD-FC de mNOPE (23-956), se expresó transitoriamente y se purificó como se describe en el Ejemplo 1. Se asignaron aleatoriamente ratones BalbC hembra (Charles River Labs, Wilmington, MA) a 2 grupos de tratamiento de 10 ratones cada uno. El día 0, los ratones fueron sometidos a un análisis de masa magra como se describió anteriormente para establecer mediciones iniciales. Una vez que se registraron las mediciones iniciales, a los ratones se les administró vehículo o 45 mg/kg de proteína ECD-FC de mNOPE (23-956) recombinante purificada dos veces por semana. Los días 6, 11, 14 y 17 se midió la masa magra. La exposición a NOPE demostró un efecto anabólico en la masa magra en el espacio de los 6 días posteriores a la primera dosis (Figura 3C). El aumento de masa magra persistió durante todo el estudio. Después de 17 días, se recogieron y pesaron los órganos. El anabolismo de la masa magra se tradujo en un aumento significativo del peso del músculo esquelético y del corazón en animales expuestos a ECD-FC (23-956) de mNOPE, mientras que el hígado permaneció sin cambios (Figura 3D). Estos resultados confirman las observaciones de los autores de la invención mediante transfección hidrodinámica de que la exposición sistémica a NOPE conduce al anabolismo muscular en ratones.

Ejemplo 3: NOPE se une a miostatina *in vitro*

La tecnología de resonancia de plasmón de superficie Biacore® T100 (GE, NY, EE.UU.) se utilizó para determinar la afinidad de NOPE-FC humano y de ratón por la miostatina y la pro-miostatina (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se seleccionó la miostatina para determinar si un mecanismo para fomentar el crecimiento muscular *in vivo* era actuar como trampa de ligando de miostatina en la circulación. Se construyeron ECD-FC (1-957) de hNOPE y ECD-FC (1-955) de mNOPE, se expresaron transitoriamente y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1.

Brevemente, un anticuerpo anti-humano (GE Lifesciences, NY, EE.UU.) se enlazó a un chip CM4 mediante acoplamiento de aminas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tanto ECD-FC (1-957) de hNOPE como ECD-FC (1-955) de mNOPE se capturaron en el chip mediante interacción con el anticuerpo anti-humano. Una celda de flujo sin ECD-FC de NOPE sirvió como control de referencia. La miostatina y la promiostatina se adquirieron de R&D Systems (MN, EE.UU.). Se inyectó una respuesta a la dosis de miostatina o pro-miostatina y luego se monitorizó la disociación a lo largo del tiempo. La constante de asociación, la constante de disociación y la afinidad de la proteína ECD-FC de NOPE o del receptor de activina 2B-FC (R&D Systems, MN, EE.UU.), un control positivo para la unión de miostatina, se calcularon utilizando el paquete de software de evaluación Biacore T100 utilizando el modelo de unión Langmuir 1:1. La afinidad por el ECD-FC (1-957) de NOPE humano y el ECD-FC (1-955) de NOPE de ratón por MSTN son 0,2 nM y 0,8 nM, respectivamente, mientras que la afinidad por el control positivo, ActR2b-FC es 2,5 nM. ECD-FC de NOPE y ActR2b-FC no se unen a pro-MSTN. Como se muestra en la Figura 4, las proteínas NOPE tienen afinidades similares por la miostatina y no se unen a la pro-miostatina.

Ejemplo 4: Estudios de estructura-función identifican los dominios funcionales de NOPE

Para comprender la implicación funcional de la interacción entre NOPE y miostatina, los autores de la invención emplearon un ensayo informador basado en células para testar la capacidad de NOPE de inhibir la señalización de miostatina. Además, crearon mutantes de truncamiento para determinar los dominios funcionales importantes de NOPE como se describe en el Ejemplo 1. La luciferasa Cignal Lenti Smad 2/3 (Qiagen) se transformó en células HEK293 y se utilizó para testar la capacidad de las proteínas NOPE de inhibir la miostatina dependiente de la activación de SMAD2/3. Se generó una curva de dosis-respuesta de miostatina para determinar la CE80 de la actividad de SMAD2/3. Se expuso 0,1 nM de miostatina, CE80, a una dosis respuesta de ECD-FC (1-955) de mNOPE, ECD-FC (1-957) de hNOPE, ECD-FC (1-427) de hNOPE, ECD-FC (1-620) de hNOPE y ECD-FC (427-955) de hNOPE. Como se demuestra en la Figura 5, la interacción con NOPE da como resultado la neutralización de la actividad de miostatina. La CI50 de la inhibición de miostatina por ECD-FC (1-957) de hNOPE y ECD-FC (1-620) de hNOPE es de 0,5 y 0,17 nM, respectivamente. ECD-FC (1-955) de mNOPE tiene una CI50 de 0,068 nM que es 7 veces mayor que ECD-FC (1-957) de hNOPE y 2,5 veces mayor que ECD-FC (1-620) de hNOPE. ECD-FC (1-427) de hNOPE y ECD-FC (427-955) de hNOPE no inhibieron la activación de Smad 2/3 inducida por miostatina (Figura 5).

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si la inyección hidrodinámica en la vena de la cola de las proteínas NOPE tiene un impacto en el crecimiento muscular *in vivo.* Se asignaron al azar ratones BalbC hembra (Charles River Labs, Wilmington, MA) a 4 grupos de tratamiento de 10 ratones cada uno (Figura 6). El día 0, los ratones fueron sometidos a un análisis de masa magra como se describió en el Ejemplo 2 para establecer mediciones iniciales. Una vez que se registraron las mediciones iniciales, los ratones se transfectaron hidrodinámicamente con ECD-FC (1-955) de mNOPE, ECD-FC (1-619) de mNOPE o ECD-FC (623-955) de mNOPE o control de Vehículo. Los días 7 y 14 se midió la masa magra. La exposición a ECD-FC (1-955) de mNOPE, así como de ECD-FC (1-619) de mNOPE demostró efectos anabólicos en la masa magra en el espacio de 7 días de la exposición. El aumento de masa magra persistió durante todo el estudio. Después de 14 días, se recogieron y pesaron los órganos de masa magra para confirmar que el aumento de masa magra era específico para el músculo. El anabolismo de la masa magra se traduce en un aumento significativo del músculo esquelético en animales expuestos a ECD-FC (1-955) de mNOPE y ECD-FC (1-619) de mNOPE, mientras que el hígado no se vio afectado. ECD-FC (623-955) de mNOPE no tuvo efecto alguno sobre la masa magra o el peso muscular.

TABLA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	Precursor de NOPE humano (1-1250), con péptido señal	MARGDAGRGR GLLALTFCLL AARGELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT PSMHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHSVTGII VGVCLGLLCL LACMCAGLRR SPHRESLPGL SSTATPGNPA LYSRARLGPP SPPAAHELES LVHPHPQDWS PPPSDVEDRA EVHSLMGGGV SEGRSHSKRK ISWAQPSGLS WAGSWAGCEL PQAGPRPALT RALLPPAGTG QTLLLQALVY DAIKGNGRKK SPPACRNQVE AEVIVHSDFS ASNGNPDLHL QDLEPEDPLP PEAPDLISGV GDPGQGAAWL DRELGGCELA APGPDRLTCL PEAASASCSY PDLQPGEVLE ETPGDSCQLK SPCPLGASPG LPRSPVSSSA
2	NOPE maduro humano (25-1250), sin péptido señal	ELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT PSMHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHSVTGII VGVCLGLLCL LACMCAGLRR SPHRESLPGL SSTATPGNPA LYSRARLGPP SPPAAHELES LVHPHPQDWS PPPSDVEDRA EVHSLMGGGV SEGRSHSKRK ISWAQPSGLS WAGSWAGCEL PQAGPRPALT RALLPPAGTG QTLLLQALVY DAIKGNGRKK SPPACRNQVE AEVIVHSDFS ASNGNPDLHL QDLEPEDPLP PEAPDLISGV GDPGQGAAWL

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		DRELGGCELA APGPDRLTCL PEAASASCSY PDLQPGEVLE ETPGDSCQLK SPCPLGASPG LPRSPVSSSA
3	Precursor de NOPE de ratón (1-1252), con péptido señal	MARADTGRGL LVLTFCLLSA RGELPLPQET TVKLSCDEGP LQVILGPEQA VVLDCTLGAT AAGPPTRVTW SKDGDTVLEH ENLHLLPNGS LWLSSPLEQE DSDDEEALRI WKVTEGSYSC LAHSPLGVVA SQVAVVKLAT LEDFSLHPES QIVEENGTAR FECHTKGLPA PIITWEKDQV TVPEESRLIT LPNGVLQILD VQDSDAGSYR CVATNSARQR FSQEASLTVA LRGSLEATRG QDVVIVAAPE NTTVVSGQSV VMECVASADP TPFVSWVRQD GKPISTDVIV LGRTNLLIAS AQPRHSGVYV CRANKPRTRD FATAAAELRV LAAPAISQAP EALSRTRAST ARFVCRASGE PRPALHWLHD GIPLRPNGRV KVQGGGGSLV ITQIGLQDAG YYQCVAENSA GTACAAAPLA VVVREGLPSA PTRVTATPLS SSSVLVAWER PELHSEQIIG FSLHYQKARG VDNVEYQFAV NNDTTELQVR DLEPNTDYEF YVVAYSQLGA SRTSSPALVH TLDDVPSAAP QLTLSSPNPS DIRVAWLPLP SSLSNGQVLK YKIEYGLGKE DQVFSTEVPG NETQLTLNSL QPNKVYRVRI SAGTGAGYGV PSQWMQHRTP GVHNQSHVPF APAELKVRAK MESLVVSWQP PPHPTQISGY KLYWREVGTE EEADGDRPPG GRGDQAWDVG PVRLKKKVKQ YELTQLVPGR LYEVKLVAFN KHEDGYAAVW KGKTEKAPTP DLPIQRGPPL PPAHVHAESN SSTSIWLRWK KPDFTTVKIV NYTVRFGPWG LRNASLVTYY TSSGEDILIG GLKPFTKYEF AVQSHGVDMD GPFGSVVERS TLPDRPSTPP SDLRLSPLTP STVRLHWCPP TEPNGEIVEY LILYSNNHTQ PEHQWTLLTT EGNIFSAEVH GLESDTRYFF KMGARTEVGP GPFSRLQDVI TLQKTFSDSL DVHAVTGIIV GVCLGLLCLL ACMCAGLRRS SHREALPGLS SSGTPGNPAL YTRARLGPPS VPAAHELESL VHPRPQDWSP PPSDVEDKAE VHSLMGGSVS DCRGHSKRKI SWAQAGGPNW AGSWAGCELP QGSGPRPALT RALLPPAGTG QTLLLQALVY DAIKSNGRKK PSPACRNQVE AEVIVHSDFG ASKGCPDLHL QDLEPEEPLT AETLPSTSGA VDLSQGADWL GRELGGCQPT TSGPERLTCL PEAASASCSC SDLQPSTAIE EAPGKSCQPK ALCPLTVSPS LPRAPVSSAQ VP

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
4	NOPE maduro de ratón (23-1252), sin péptido señal	ELPLPQET TVKLSCDEGP LQVILGPEQA VVLDCTLGAT AAGPPTRVTW SKDGDTVLEH ENLHLLPNGS LWLSSPLEQE DSDDEEALRI WKVTEGSYSC LAHSPLGVVA SQVAVVKLAT LEDFSLHPES QIVEENGTAR FECHTKGLPA PIITWEKDQV TVPEESRLIT LPNGVLQILD VQDSDAGSYR CVATNSARQR FSQEASLTVA LRGSLEATRG QDVVIVAAPE NTTVVSGQSV VMECVASADP TPFVSWVRQD GKPISTDVIV LGRTNLLIAS AQPRHSGVYV CRANKPRTRD FATAAAELRV LAAPAISQAP EALSRTRAST ARFVCRASGE PRPALHWLHD GIPLRPNGRV KVQGGGGSLV ITQIGLQDAG YYQCVAENSA GTACAAAPLA VVVREGLPSA PTRVTATPLS SSSVLVAWER PELHSEQIIG FSLHYQKARG VDNVEYQFAV NNDTTELQVR DLEPNTDYEF YVVAYSQLGA SRTSSPALVH TLDDVPSAAP QLTLSSPNPS DIRVAWLPLP SSLSNGQVLK YKIEYGLGKE DQVFSTEVPG NETQLTLNSL QPNKVYRVRI SAGTGAGYGV PSQWMQHRTP GVHNQSHVPF APAELKVRAK MESLVVSWQP PPHPTQISGY KLYWREVGTE EEADGDRPPG GRGDQAWDVG PVRLKKKVKQ YELTQLVPGR LYEVKLVAFN KHEDGYAAVW KGKTEKAPTP DLPIQRGPPL PPAHVHAESN SSTSIWLRWK KPDFTTVKIV NYTVRFGPWG LRNASLVTYY TSSGEDILIG GLKPFTKYEF AVQSHGVDMD GPFGSVVERS TLPDRPSTPP SDLRLSPLTP STVRLHWCPP TEPNGEIVEY LILYSNNHTQ PEHQWTLLTT EGNIFSAEVH GLESDTRYFF KMGARTEVGP GPFSRLQDVI TLQKTFSDSL DVHAVTGIIV GVCLGLLCLL ACMCAGLRRS SHREALPGLS SSGTPGNPAL YTRARLGPPS VPAAHELESL VHPRPQDWSP PPSDVEDKAE VHSLMGGSVS DCRGHSKRKI SWAQAGGPNW AGSWAGCELP QGSGPRPALT RALLPPAGTG QTLLLQALVY DAIKSNGRKK PSPACRNQVE AEVIVHSDFG ASKGCPDLHL QDLEPEEPLT AETLPSTSGA VDLSQGADWL GRELGGCQPT TSGPERLTCL PEAASASCSC SDLQPSTAIE EAPGKSCQPK ALCPLTVSPS LPRAPVSSAQ VP
5	Dominio extracelular (ECD) (1-957) de NOPE humano, con péptido señal	MARGDAGRGR GLLALTFCLL AARGELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT PSMHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHSVT

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
6	ECD (25-955) de NOPE humano, sin péptido señal	ELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT PSMHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHS
7	ECD (25-426) de NOPE humano, sin péptido señal	ELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVRE
8	ECD (25-620) de NOPE humano, sin péptido señal	ELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ
		HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
9	ECD (427-955) de NOPE humano	GLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT PSMHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHS
10	ECD (623-955) de NOPE humano	MHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHS
11	Dominio extracelular (ECD) (1-956) de NOPE de ratón, con péptido señal	MARADTGRGL LVLTFCLLSA RGELPLPQET TVKLSCDEGP LQVILGPEQA VVLDCTLGAT AAGPPTRVTW SKDGDTVLEH ENLHLLPNGS LWLSSPLEQE DSDDEEALRI WKVTEGSYSC LAHSPLGVVA SQVAVVKLAT LEDFSLHPES QIVEENGTAR FECHTKGLPA PIITWEKDQV TVPEESRLIT LPNGVLQILD VQDSDAGSYR CVATNSARQR FSQEASLTVA LRGSLEATRG QDVVIVAAPE NTTVVSGQSV VMECVASADP TPFVSWVRQD GKPISTDVIV LGRTNLLIAS AQPRHSGVYV CRANKPRTRD FATAAAELRV LAAPAISQAP EALSRTRAST ARFVCRASGE PRPALHWLHD GIPLRPNGRV KVQGGGGSLV ITQIGLQDAG YYQCVAENSA GTACAAAPLA VVVREGLPSA PTRVTATPLS SSSVLVAWER PELHSEQIIG FSLHYQKARG VDNVEYQFAV NNDTTELQVR DLEPNTDYEF YVVAYSQLGA SRTSSPALVH TLDDVPSAAP QLTLSSPNPS DIRVAWLPLP SSLSNGQVLK YKIEYGLGKE DQVFSTEVPG NETQLTLNSL QPNKVYRVRI SAGTGAGYGV PSQWMQHRTP GVHNQSHVPF APAELKVRAK MESLVVSWQP PPHPTQISGY KLYWREVGTE EEADGDRPPG GRGDQAWDVG PVRLKKKVKQ YELTQLVPGR LYEVKLVAFN KHEDGYAAVW KGKTEKAPTP DLPIQRGPPL PPAHVHAESN SSTSIWLRWK KPDFTTVKIV NYTVRFGPWG LRNASLVTYY TSSGEDILIG GLKPFTKYEF AVQSHGVDMD GPFGSVVERS TLPDRPSTPP SDLRLSPLTP STVRLHWCPP TEPNGEIVEY LILYSNNHTQ PEHQWTLLTT EGNIFSAEVH GLESDTRYFF KMGARTEVGP GPFSRLQDVI TLQKTFSDSL DVHAVT

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
12	ECD (23-956) de NOPE de ratón, sin péptido señal	ELPLPQET TVKLSCDEGP LQVILGPEQA VVLDCTLGAT AAGPPTRVTW SKDGDTVLEH ENLHLLPNGS LWLSSPLEQE DSDDEEALRI WKVTEGSYSC LAHSPLGVVA SQVAVVKLAT LEDFSLHPES QIVEENGTAR FECHTKGLPA PIITWEKDQV TVPEESRLIT LPNGVLQILD VQDSDAGSYR CVATNSARQR FSQEASLTVA LRGSLEATRG QDVVIVAAPE NTTVVSGQSV VMECVASADP TPFVSWVRQD GKPISTDVIV LGRTNLLIAS
		AQPRHSGVYV CRANKPRTRD FATAAAELRV LAAPAISQAP EALSRTRAST ARFVCRASGE PRPALHWLHD GIPLRPNGRV KVQGGGGSLV ITQIGLQDAG YYQCVAENSA GTACAAAPLA VVVREGLPSA PTRVTATPLS SSSVLVAWER PELHSEQIIG FSLHYQKARG VDNVEYQFAV NNDTTELQVR DLEPNTDYEF YVVAYSQLGA SRTSSPALVH TLDDVPSAAP QLTLSSPNPS DIRVAWLPLP SSLSNGQVLK YKIEYGLGKE DQVFSTEVPG NETQLTLNSL QPNKVYRVRI SAGTGAGYGV PSQWMQHRTP GVHNQSHVPF APAELKVRAK MESLVVSWQP PPHPTQISGY KLYWREVGTE EEADGDRPPG GRGDQAWDVG PVRLKKKVKQ YELTQLVPGR LYEVKLVAFN KHEDGYAAVW KGKTEKAPTP DLPIQRGPPL PPAHVHAESN SSTSIWLRWK KPDFTTVKIV NYTVRFGPWG LRNASLVTYY TSSGEDILIG GLKPFTKYEF AVQSHGVDMD GPFGSVVERS TLPDRPSTPP SDLRLSPLTP STVRLHWCPP TEPNGEIVEY LILYSNNHTQ PEHQWTLLTT EGNIFSAEVH GLESDTRYFF KMGARTEVGP GPFSRLQDVI TLQKTFSDSL DVHAVT
13	ECD (23-619) de NOPE de ratón, sin péptido señal	ELPLPQET TVKLSCDEGP LQVILGPEQA VVLDCTLGAT AAGPPTRVTW SKDGDTVLEH ENLHLLPNGS LWLSSPLEQE DSDDEEALRI WKVTEGSYSC LAHSPLGVVA SQVAVVKLAT LEDFSLHPES QIVEENGTAR FECHTKGLPA PIITWEKDQV TVPEESRLIT LPNGVLQILD VQDSDAGSYR CVATNSARQR FSQEASLTVA LRGSLEATRG QDVVIVAAPE NTTVVSGQSV VMECVASADP TPFVSWVRQD GKPISTDVIV LGRTNLLIAS AQPRHSGVYV CRANKPRTRD FATAAAELRV LAAPAISQAP EALSRTRAST ARFVCRASGE PRPALHWLHD GIPLRPNGRV KVQGGGGSLV ITQIGLQDAG YYQCVAENSA GTACAAAPLA VVVREGLPSA PTRVTATPLS SSSVLVAWER PELHSEQIIG FSLHYQKARG VDNVEYQFAV NNDTTELQVR DLEPNTDYEF YVVAYSQLGA SRTSSPALVH TLDDVPSAAP QLTLSSPNPS DIRVAWLPLP SSLSNGQVLK YKIEYGLGKE DQVFSTEVPG NETQLTLNSL QPNKVYRVRI SAGTGAGYGV PSQWMQHRT
14	ECD (623-956) de NOPE de ratón, sin péptido señal	HNQSHVPF APAELKVRAK MESLVVSWQP PPHPTQISGY KLYWREVGTE EEADGDRPPG GRGDQAWDVG PVRLKKKVKQ YELTQLVPGR LYEVKLVAFN KHEDGYAAVW KGKTEKAPTP DLPIQRGPPL PPAHVHAESN SSTSIWLRWK KPDFTTVKIV NYTVRFGPWG LRNASLVTYY TSSGEDILIG GLKPFTKYEF AVQSHGVDMD GPFGSVVERS TLPDRPSTPP SDLRLSPLTP STVRLHWCPP TEPNGEIVEY LILYSNNHTQ PEHQWTLLTT EGNIFSAEVH GLESDTRYFF KMGARTEVGP GPFSRLQDVI TLQKTFSDSL DVHAVT

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
15	Molécula de fusión del ECD (25-955)-Fc de NOPE humano, sin péptido señal	ELLLPQETTV ELSCGVGPLQ VILGPEQAAV LNCSLGAAAA GPPTRVTWSK DGDTLLEHDH LHLLPNGSLW LSQPLAPNGS DESVPEAVGV IEGNYSCLAH GPLGVLASQT AVVKLATLAD FSLHPESQTV EENGTARFEC HIEGLPAPII TWEKDQVTLP EEPRLIVLPN GVLQILDVQE SDAGPYRCVA TNSARQHFSQ EALLSVAHRG SLASTRGQDV VIVAAPENTT VVSGQSVVME CVASADPTPF VSWVRQDGKP ISTDVIVLGR TNLLIANAQP WHSGVYVCRA NKPRTRDFAT AAAELRVLAA PAITQAPEAL SRTRASTARF VCRASGEPRP ALRWLHNGAP LRPNGRVKVQ GGGGSLVITQ IGLQDAGYYQ CVAENSAGMA CAAASLAVVV REGLPSAPTR VTATPLSSSA VLVAWERPEM HSEQIIGFSL HYQKARGMDN VEYQFAVNND TTELQVRDLE PNTDYEFYVV AYSQLGASRT STPALVHTLD DVPSAAPQLS LSSPNPSDIR VAWLPLPPSL SNGQVVKYKI EYGLGKEDQI FSTEVRGNET QLMLNSLQPN KVYRVRISAG TAAGFGAPSQ WMHHRTPSMH NQSHVPFAPA ELKVQAKMES LVVSWQPPPH PTQISGYKLY WREVGAEEEA NGDRLPGGRG DQAWDVGPVR LKKKVKQYEL TQLVPGRLYE VKLVAFNKHE DGYAAVWKGK TEKAPAPDMP IQRGPPLPPA HVHAESNSST SIWLRWKKPD FTTVKIVNYT VRFSPWGLRN ASLVTYYTSS GEDILIGGLK PFTKYEFAVQ SHGVDMDGPF GSVVERSTLP DRPSTPPSDL RLSPLTPSTV RLHWCPPTEP NGEIVEYLIL YSSNHTQPEH QWTLLTTQGN IFSAEVHGLE SDTRYFFKMG ARTEVGPGPF SRLQDVITLQ EKLSDSLDMH SGSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
16	Molécula de fusión ECD (25-426)-Fc de NOPE humano, sin péptido señal	ELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
17	Molécula de fusión ECD (25-620)-Fc de NOPE humano, sin péptido señal	ELLLPQ ETTVELSCGV GPLQVILGPE QAAVLNCSLG AAAAGPPTRV TWSKDGDTLL EHDHLHLLPN GSLWLSQPLA PNGSDESVPE AVGVIEGNYS CLAHGPLGVL ASQTAVVKLA TLADFSLHPE SQTVEENGTA RFECHIEGLP APIITWEKDQ VTLPEEPRLI VLPNGVLQIL DVQESDAGPY RCVATNSARQ HFSQEALLSV AHRGSLASTR GQDVVIVAAP ENTTVVSGQS VVMECVASAD PTPFVSWVRQ DGKPISTDVI VLGRTNLLIA NAQPWHSGVY VCRANKPRTR DFATAAAELR VLAAPAITQA PEALSRTRAS TARFVCRASG EPRPALRWLH NGAPLRPNGR VKVQGGGGSL VITQIGLQDA GYYQCVAENS AGMACAAASL AVVVREGLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT**GS**EPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
18	Molécula de fusión ECD (427-955)-Fc de NOPE humano, sin péptido señal	GLPS APTRVTATPL SSSAVLVAWE RPEMHSEQII GFSLHYQKAR GMDNVEYQFA VNNDTTELQV RDLEPNTDYE FYVVAYSQLG ASRTSTPALV HTLDDVPSAA PQLSLSSPNP SDIRVAWLPL PPSLSNGQVV KYKIEYGLGK EDQIFSTEVR GNETQLMLNS LQPNKVYRVR ISAGTAAGFG APSQWMHHRT PSMHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHS**GS**EPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
19	Molécula de fusión ECD (623-955)-Fc de NOPE humano, sin péptido señal	MHNQSHVP FAPAELKVQA KMESLVVSWQ PPPHPTQISG YKLYWREVGA EEEANGDRLP GGRGDQAWDV GPVRLKKKVK QYELTQLVPG RLYEVKLVAF NKHEDGYAAV WKGKTEKAPA PDMPIQRGPP LPPAHVHAES NSSTSIWLRW KKPDFTTVKI VNYTVRFSPW GLRNASLVTY YTSSGEDILI GGLKPFTKYE FAVQSHGVDM DGPFGSVVER STLPDRPSTP PSDLRLSPLT PSTVRLHWCP PTEPNGEIVE YLILYSSNHT QPEHQWTLLT TQGNIFSAEV HGLESDTRYF FKMGARTEVG PGPFSRLQDV ITLQEKLSDS LDMHS**GS**EPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
20	Miostatina humana	DFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA PKRYKANYCS GECEFVFLQK YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RCGCS
21	Pro-miostatina humana (con secuencia señal)	MQKLQLCVYI YLFMLIVAGP VDLNENSEQK ENVEKEGLCN ACTWRQNTKS SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL LPKAPPLREL IDQYDVQRDD SSDGSLEDDD YHATTETIIT MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK VVKAQLWIYL RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMNPGT GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGIEIKAL DENGHDLAVT FPGPGEDGLN PFLEVKVTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA PKRYKANYCS GECEFVFLQK YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RCGCS
22	Pro-miostatina humana (sin secuencia señal)	NENSEQK ENVEKEGLCN ACTWRQNTKS SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL LPKAPPLREL IDQYDVQRDD SSDGSLEDDD YHATTETIIT MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK VVKAQLWIYL RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMNPGT GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGIEIKAL DENGHDLAVT FPGPGEDGLN PFLEVKVTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA PKRYKANYCS GECEFVFLQK YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RCGCS
23	Miostatina de ratón	DFG LDCDEHSTES RCCRYPLTVD FEAFGWDWII APKRYKANYC SGECEFVFLQ KYPHTHLVHQ ANPRGSAGPC CTPTKMSPIN MLYFNGKEQI IYGKIPAMVV DRCGCS

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
24	Pro-miostatina de ratón (con secuencia señal)	MMQKLQMYVY IYLFMLIAAG PVDLNEGSER EENVEKEGLC NACAWRQNTR YSRIEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ LLPRAPPLRE LIDQYDVQRD DSSDGSLEDD DYHATTETII TMPTESDFLM QADGKPKCCF FKFSSKIQYN KVVKAQLWIY LRPVKTPTTV FVQILRLIKP MKDGTRYTGI RSLKLDMSPG TGIWQSIDVK TVLQNWLKQP ESNLGIEIKA LDENGHDLAV TFPGPGEDGL NPFLEVKVTD TPKRSRRDFG LDCDEHSTES RCCRYPLTVD FEAFGWDWII APKRYKANYC SGECEFVFLQ KYPHTHLVHQ ANPRGSAGPC CTPTKMSPIN MLYFNGKEQI IYGKIPAMVV DRCGCS
25	Pro-miostatina de ratón (sin secuencia señal)	EGSER EENVEKEGLC NACAWRQNTR YSRIEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ LLPRAPPLRE LIDQYDVQRD DSSDGSLEDD DYHATTETII TMPTESDFLM QADGKPKCCF FKFSSKIQYN KVVKAQLWIY LRPVKTPTTV FVQILRLIKP MKDGTRYTGI RSLKLDMSPG TGIWQSIDVK TVLQNWLKQP ESNLGIEIKA LDENGHDLAV TFPGPGEDGL NPFLEVKVTD TPKRSRRDFG LDCDEHSTES RCCRYPLTVD FEAFGWDWII APKRYKANYC SGECEFVFLQ KYPHTHLVHQ ANPRGSAGPC CTPTKMSPIN MLYFNGKEQI IYGKIPAMVV DRCGCS
26	Fc C237S	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
27	Fc nº 1 ejemplar	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
28	Fc nº 2 ejemplar	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso en el tratamiento del desgaste muscular, lesión muscular, un trastorno degenerativo muscular o esclerosis lateral amiotrófica (ALS) en un sujeto.

2. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto con desgaste muscular tiene al menos una afección seleccionada de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad renal crónica, enfermedad renal en fase terminal, insuficiencia cardíaca crónica, cáncer, miopatía por enfermedad crítica, polineuropatía por enfermedad crítica, apoplejía, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, leucoencefalopatía multifocal progresiva, encefalomielitis, mielinolisis pontina central, adrenoleucodistrofia, degeneración walleriana, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, leucodistrofia de células globoides y sarcopenia.

3. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 1, en donde la lesión muscular se selecciona de lesión muscular relacionada con cirugía, lesión muscular traumática, lesión del músculo esquelético relacionada con el trabajo y lesión muscular relacionada con el sobre-entrenamiento.

4. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno degenerativo muscular se selecciona de distrofia muscular, distrofia miotónica, polimiositis y dermatomiositis.

5. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 4, en donde el trastorno degenerativo muscular es distrofia muscular.

6. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 5, en donde la distrofia muscular se selecciona de distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita (Fukuyama), distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cinturas y distrofia muscular facioescapulohumeral.

7. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 4, en donde el trastorno degenerativo muscular es distrofia miotónica y se selecciona de distrofia miotónica tipo I, distrofia miotónica tipo II y miotonía congénita.

8. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido del dominio extracelular (ECD) de NOPE es una molécula de fusión del ECD de NOPE.

9. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido del ECD de NOPE o la molécula de fusión del ECD de NOPE comprende los aminoácidos 26 a 620 de SEQ ID NO: 1.

10. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 8, en donde la molécula de fusión del ECD de NOPE comprende un polipéptido ECD de NOPE y un participante en la fusión.

11. El polipéptido de dominio extracelular (ECD) de NOPE para uso de la reivindicación 10, en donde el participante en la fusión es un Fc.

12. Una molécula de fusión del ECD de NOPE que comprende polipéptido del ECD de NOPE y un participante en la fusión, en donde la molécula de fusión comprende los aminoácidos 26 a 620 de SEQ ID NO: 1 y el participante en la fusión es un Fc.

13. Un polinucleótido que codifica la molécula de fusión del ECD de NOPE de la reivindicación 12.

14. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 13.

15. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 14.

Figura 1

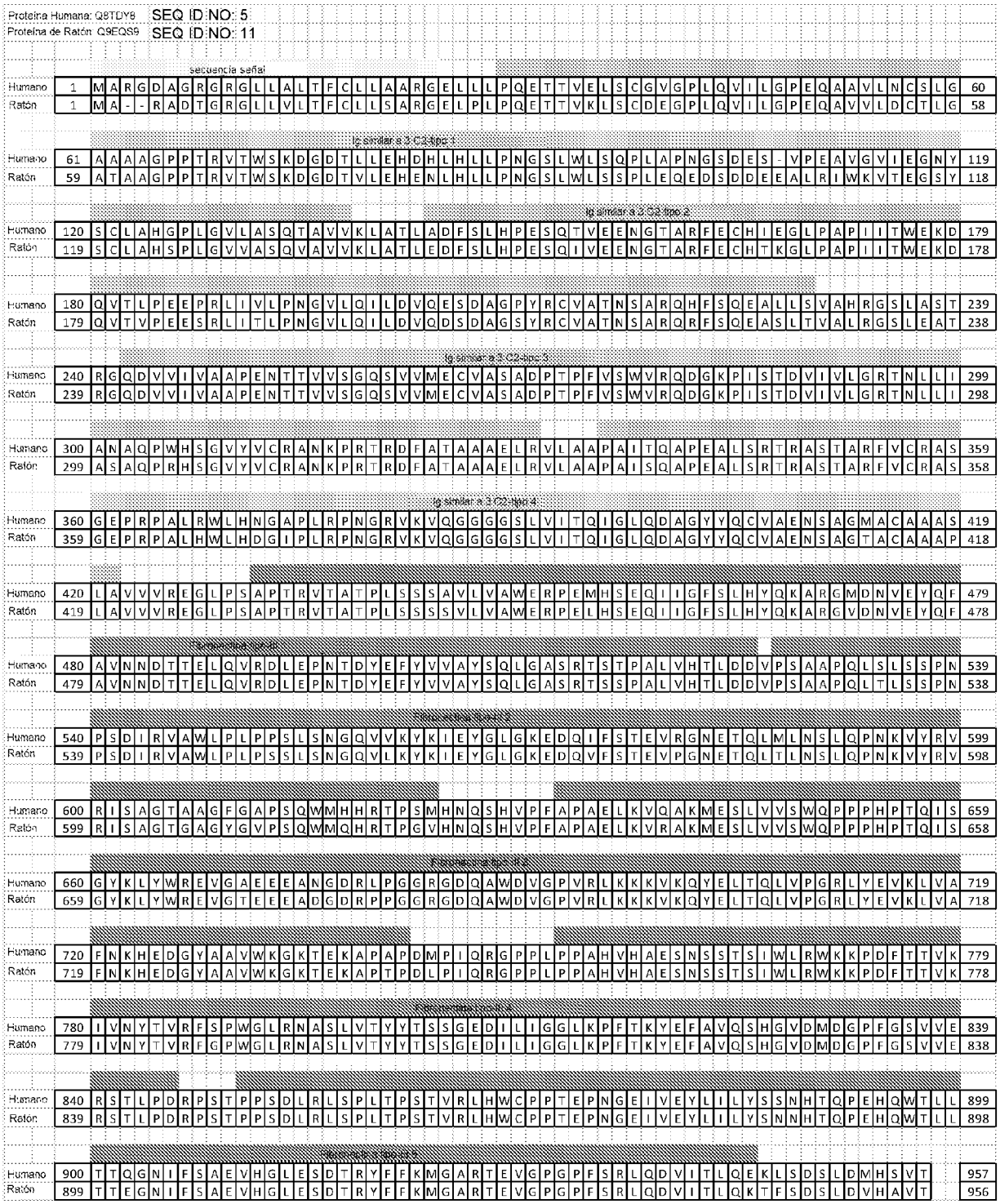
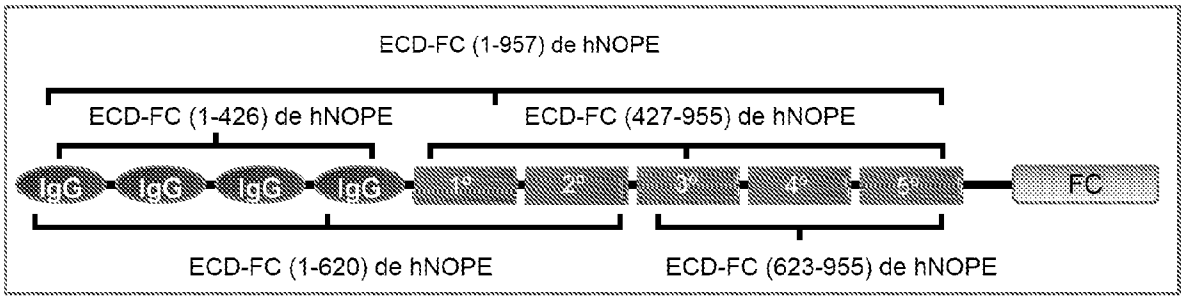
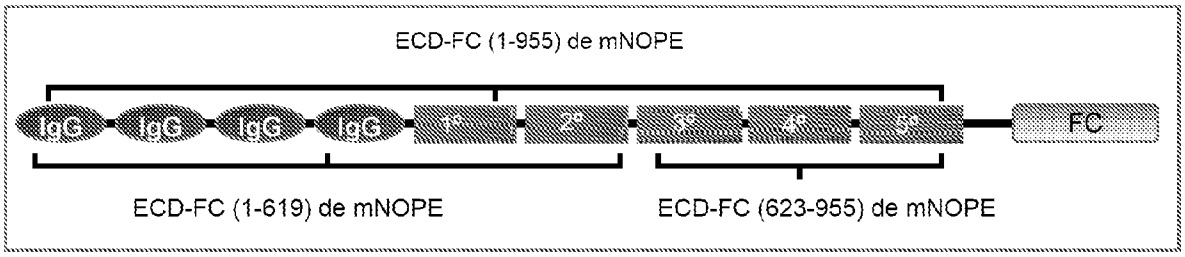

Proteína Humana: Q8TDY8 SEQ ID NO: 5
Proteína de Ratón: Q9EQS9 SEQ ID NO: 11
secuencia señal
Ig similar a 3 C2-tipo 1
Ig similar a 3 C2-tipo 2
Ig similar a 3 C2-tipo 3
Ig similar a 3 C2-tipo 4
Fibronectina tipo III
Fibronectina tipo III 2
Fibronectina tipo III 3
Fibronectina tipo III 4
Fibronectina tipo III 5
Humano 1 MARGDAGRGRGLLALTFCLLAARGELLLPQETTVELSCGVGPLQVILGPEQAAVLNCSLG 60
Ratón 1 MA--RADTGRGLLVLTFCLLSARGELPLPQETTVKLSCDEGPLQVILGPEQAVVLDCTLG 58
Humano 61 AAAAGPPTRVTWSKDGDTLLEHDHLHLLPNGSLWLSQPLAPNGSDES-VPEAVGVIEGNY 119
Ratón 59 ATAAGPPTRVTWSKDGDTVLEHENLHLLPNGSLWLSSPLEQEDSDDEEALRIWKVTEGSY 118
Humano 120 SCLAHGPLGVLASQTAVVKLATLADFSLHPESQTVEENGTARFECHIEGLPAPIITWEKD 179
Ratón 119 SCLAHSPLGVVASQVAVVKLATLEDFSLHPESQIVEENGTARFECHTKGLPAPIITWEKD 178
Humano 180 QVTLPEEPRLIVLPNGVLQILDVQESDAGPYRCVATNSARQHFSQEALLSVAHRGSLASST 239
Ratón 179 QVTVPEESRLITLPNGVLQILDVQDSDAGSYRCVATNSARQRFSQEASLTVALRGSLEAT 238
Humano 240 RGQDVVIVAAPENTTVVSGQSVVMECVASADPTPFVSWVRQDGKPISTDVIVLGRTNLLI 299
Ratón 239 RGQDVVIVAAPENTTVVSGQSVVMECVASADPTPFVSWVRQDGKPISTDVIVLGRTNLLI 298
Humano 300 ANAQPWHSGVYVCRANKPRTRDFATAAAELRVLAAPAITQAPEALSRTRASTARFVCRAS 359
Ratón 299 ASAQPRHSGVYVCRANKPRTRDFATAAAELRVLAAPAISQAPEALSRTRASTARFVCRAS 358
Humano 360 GEPRPALRWLHNGAPLRPNGRVKVQGGGGSLVITQIGLQDAGYYQCVAENSAGMACAAAS 419
Ratón 359 GEPRPALHWLHDGIPLRPNGRVKVQGGGGSLVITQIGLQDAGYYQCVAENSAGTACAAAP 418
Humano 420 LAVVVREGLPSAPTRVTATPLSSSAVLVAWERPEMHSEQIIGFSLHYQKARGMDNVEYQF 479
Ratón 419 LAVVVREGLPSAPTRVTATPLSSSSVLVAWERPELHSEQIIGFSLHYQKARGVDNVEYQF 478
Humano 480 AVNNDTTELQVRDLEPNTDYEFYVVAYSQLGASRTSTPALVHTLDDVPSAAPQLSLSSPN 539
Ratón 479 AVNNDTTELQVRDLEPNTDYEFYVVAYSQLGASRTSSPALVHTLDDVPSAAPQLTLSSPN 538
Humano 540 PSDIRVAWLPLPPSLSNGQVVKYKIEYGLGKEDQIFSTEVRGNETQLMLNSLQPNKVYRV 599
Ratón 539 PSDIRVAWLPLPPSSLSNGQVLKYKIEYGLGKEDQVFSTEVPGNETQLTLNSLQPNKVYRV 598
Humano 600 RISAGTAAGFGAPSQWMHHRTPSMHNQSHVPFAPAELKVQAKMESLVVSWQPPPHPTQIS 659
Ratón 599 RISAGTGAGYGVPSQWMQHRTPGVHNQSHVPFAPAELKVRAKMESLVVSWQPPPHPTQIS 658
Humano 660 GYKLYWREVGAEEEANGDRLPGGRGDQAWDVGPVRLKKKVKQYELTQLVPGRLYEVKLVA 719
Ratón 659 GYKLYWREVGTEEEAADGDRPPGGRGDQAWDVGPVRLKKKVKQYELTQLVPGRLYEVKLVA 718
Humano 720 FNKHEDGYAAVWKGKTEKAPAPDMPIQRGPPLPPAHVHAESNSSTSIWLRWKKPDFTTVK 779
Ratón 719 FNKHEDGYAAVWKGKTEKAPTPDLPIQRGPPLPPAHVHAESNSSTSIWLRWKKPDFTTVK 778
Humano 780 IVNYTVRFSPWGLRNASLVTYYTSSGEDILIGGLKPFTKYEFAVQSHGVDMDGPFGSVVE 839
Ratón 779 IVNYTVRFGPWGLRNASLVTYYTSSGEDILIGGLKPFTKYEFAVQSHGVDMDGPFGSVVE 838
Humano 840 RSTLPDRPSTPPSDLRLSPLTPSTVRLHWCPPTEPNGEIVEYLILYSSNHTQPEHQWTLL 899
Ratón 839 RSTLPDRPSTPPSDLRLSPLTPSTVRLHWCPPTEPNGEIVEYLILYSNNHTQPEHQWTLL 898
Humano 900 TTQGNIFSAEVHGLESDTRYFFKMGARTEVGPGPFSRLQDVITLQEKLSDSLDMHSVT 957
Ratón 899 TTEGNIFSAEVHGLESDTRYFFKMGARTEVGPGPFSRLQDVITLQKTFSDSLDVHAVT 956

Figura 2

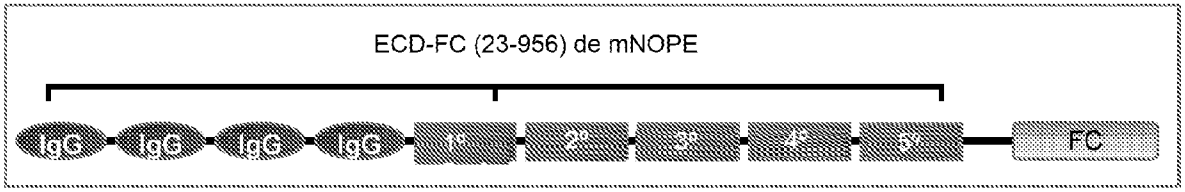
Ensayos de Actividad Biacore y Miostatina



Transfección Hidrodinámica in vivo



Validación in vivo



Nombre Proteína	Breve Descripción	Ensayo
ECD-FC (1-957) hNOPE	(ECD-FC) dominio extracelular de NOPE humano parental	ensayo biacore y actividad
ECD-FC (1-426) hNOPE	Dominios IgG N terminales de ECD-FC de NOPE humano	ensayo biacore y actividad
ECD-FC (1-620) hNOPE	Dominios IgG N terminales y primeros 2 dominios FN3 de ECD-FC de NOPE humano	ensayo biacore y actividad
ECD-FC (427-955) hNOPE	Todos los dominios FN3 de ECD-FC de NOPE humano	ensayo biacore y actividad
ECD-FC (1-955) mNOPE	(ECD)-FC dominio extracelular de NOPE de ratón parental	transfección hidrodinámica
ECD-FC (1-619) mNOPE	Dominios IgG N terminales y primeros 2 dominios FN3 de ECD-FC de NOPE de ratón	transfección hidrodinámica
ECD-FC (623-955) mNOPE	Últimos 3 dominios FN3 de ECD-FC de NOPE de ratón	transfección hidrodinámica
ECD-FC (23-956) mNOPE	(ECD)-FC dominio extracelular de NOPE de ratón parental	validación in vivo

Figura 3

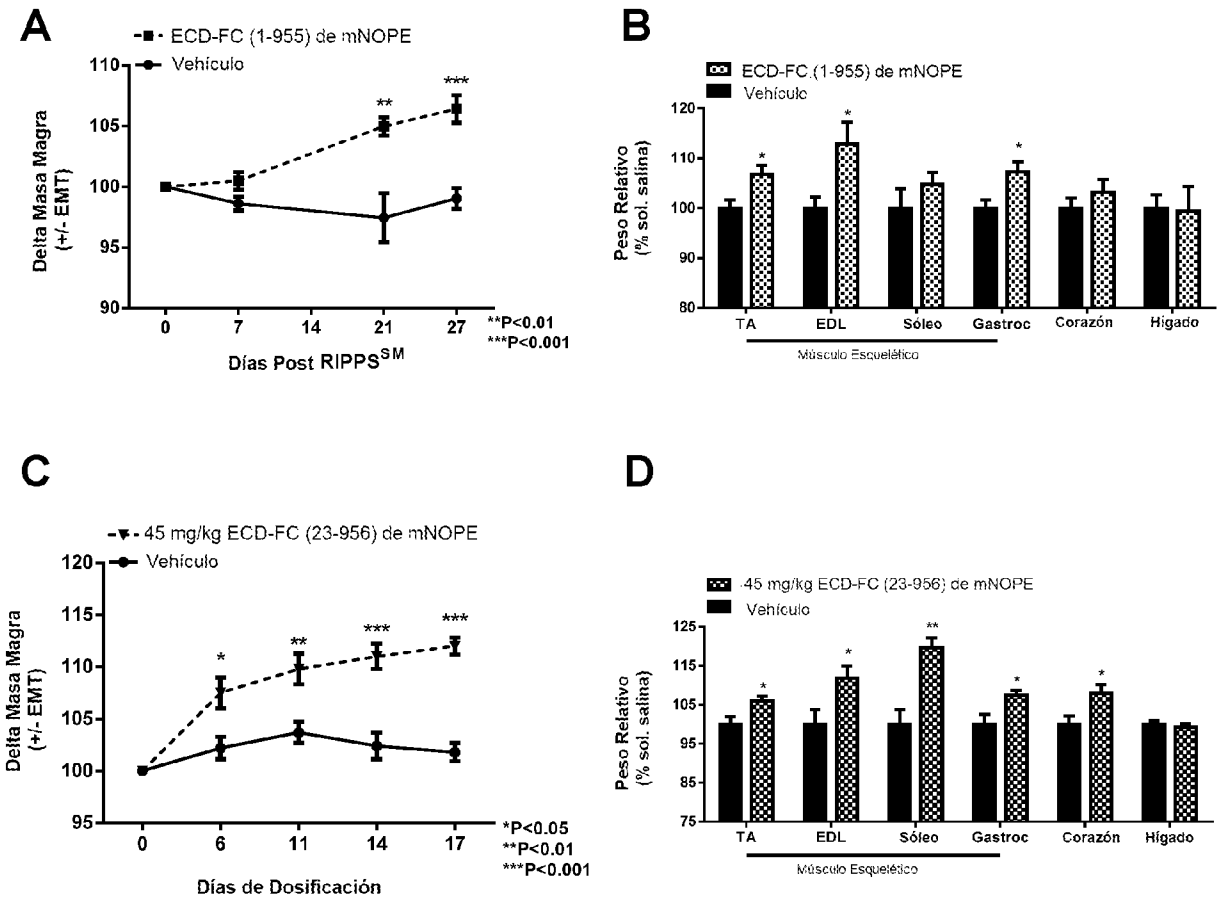
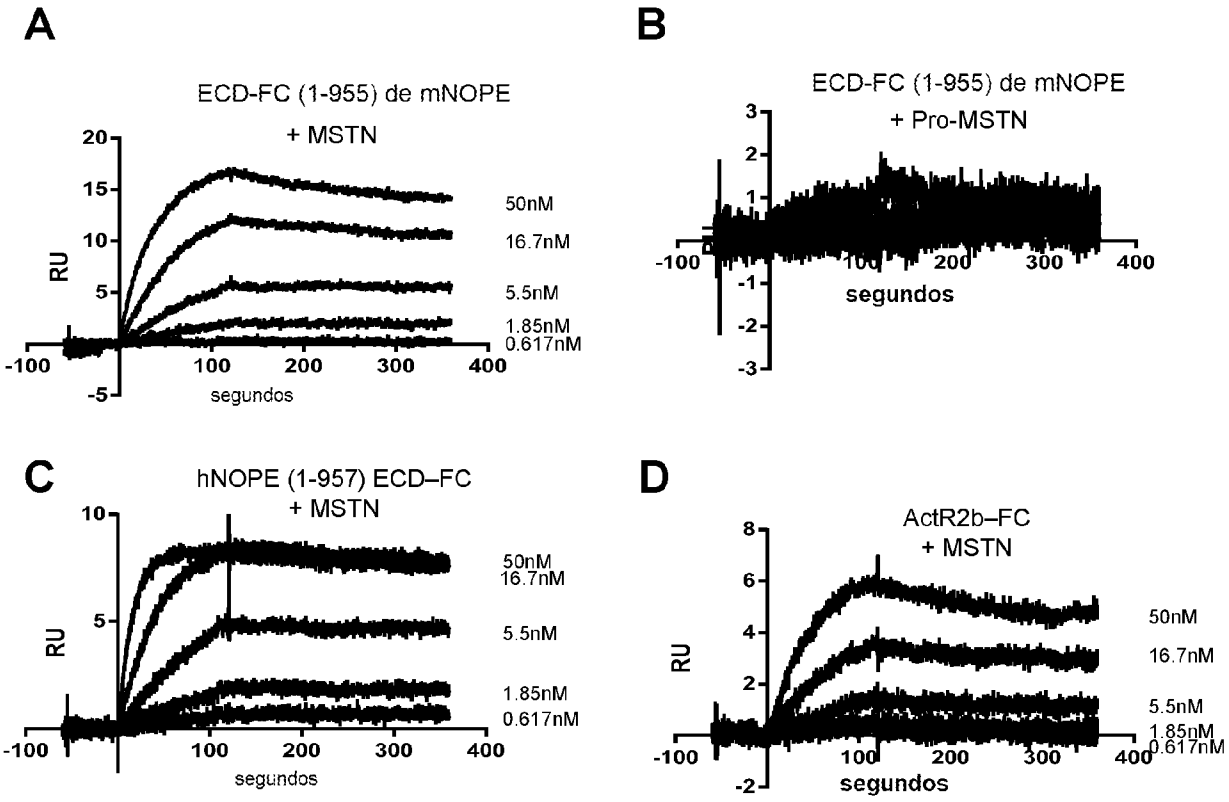

A
ECD-FC (1-955) de mNOPE
Vehículo
Delta Masa Magra (+/- EMT)
Días Post RIPPS^SM
**P<0.01
***P<0.001
B
ECD-FC (1-955) de mNOPE
Vehículo
Peso Relativo (% sol. salina)
TA
EDL
Sóleo
Gastroc
Corazón
Hígado
Músculo Esquelético
C
45 mg/kg ECD-FC (23-956) de mNOPE
Vehículo
Delta Masa Magra (+/- EMT)
Días de Dosificación
*P<0.05
**P<0.01
***P<0.001
D
45 mg/kg ECD-FC (23-956) de mNOPE
Vehículo
Peso Relativo (% sol. salina)
TA
EDL
Sóleo
Gastroc
Corazón
Hígado
Músculo Esquelético

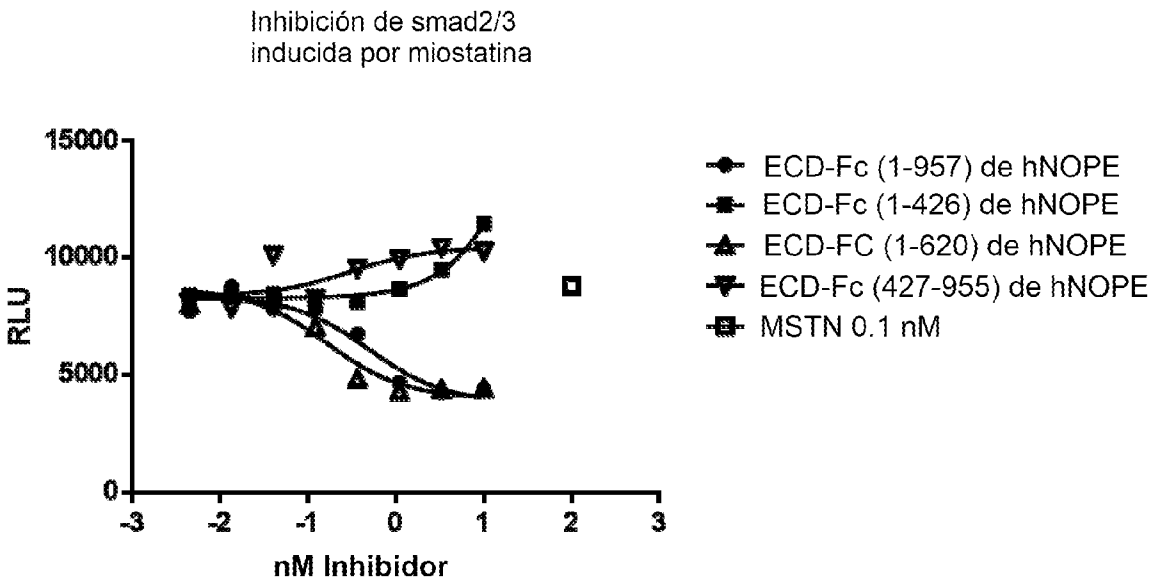
Figura 4



E

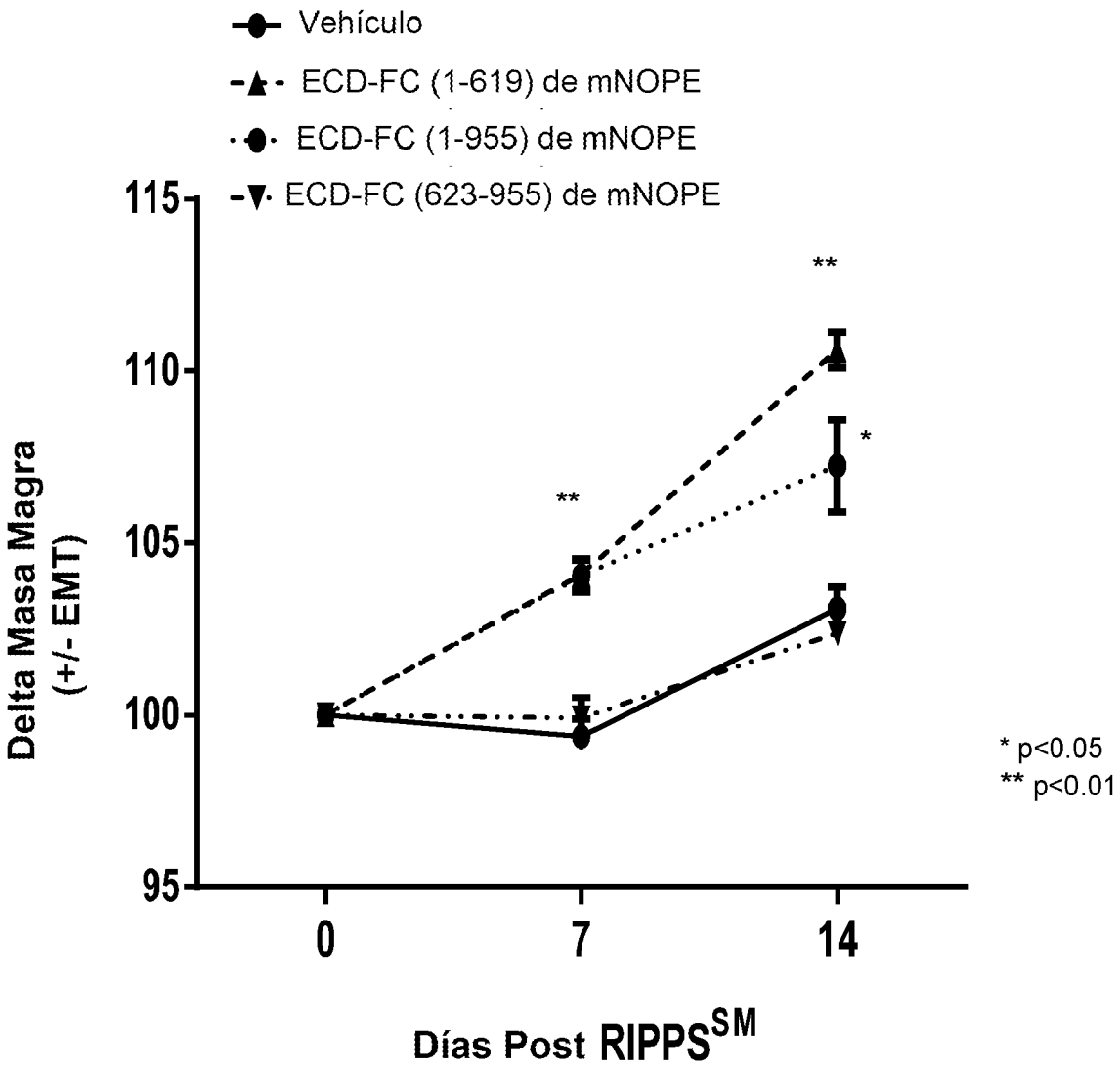
Muestra	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
Miostatina	hNOPE-FC	2.0E+06	3.2E-04	0.2
	mNOPE-FC	6.7E+05	5.8E-04	0.9
	ActR2b-FC	3.9E+05	9.8E-04	2.5
Pro Miostatina	hNOPE-FC	--	--	NB
	mNOPE-FC	--	--	NB
	ActR2b-FC	--	--	NB

Figura 5



Proteína	CI50 inhibición MSTN (nM)
ECD-Fc (1-955) mNOPE	0.068
ECD-Fc (1-957) hNOPE	0.50
ECD-Fc (1-426) hNOPE	–
ECD-Fc (1-620) hNOPE	0.17
ECD-Fc (427-955) hNOPE	–

Figura 6


Vehículo
ECD-FC (1-619) de mNOPE
ECD-FC (1-955) de mNOPE
ECD-FC (623-955) de mNOPE
115
110
105
100
95
Delta Masa Magra (+/- EMT)
**
**
*
0
7
14
Días Post RIPPS^SM
* p<0.05
** p<0.01