

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 869 864**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 14/71** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/495** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2010 E 17181410 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3260130**

54 Título: **Procedimientos para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso**

30 Prioridad:

**03.11.2009 US 280544 P**

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

**26.10.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KONCAREVIC, ALAN;  
LACHEY, JENNIFER;  
SEEHRA, JASBIR y  
SHERMAN, MATTHEW, L.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 869 864 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso

## 5 ANTECEDENTES DE LA DESCRIPCIÓN

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Estas proteínas se conocen por ejercer efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como invertebrados.

- 10 Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de métodos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia está representada por proteínas denominadas, de diversas formas, activinas e inhibinas, TGF-beta, factores de crecimiento y diferenciación (GDF) y factores morfogenéticos óseos (BMP). También se conocen
- 15 otros miembros de la familia, como Nodal y Lefty. Manipulando la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo, es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado vacuno piamontesa y azul belga llevan una mutación con pérdida de función en el gen de GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un aumento marcado en la masa muscular. Grobet y col., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 se asocian con un aumento de la masa muscular y,
- 20 según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke y col., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Los cambios en el músculo, hueso, grasa, cartílago y otros tejidos se pueden lograr mediante señalización agonizante o antagonista mediada por un miembro apropiado de la familia TGF-beta. La enfermedad del hígado graso es una afección potencialmente grave que a menudo se asocia con resistencia a la insulina, diabetes o alcoholismo para la

25 que existen pocas opciones terapéuticas. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes que funcionen como potentes reguladores de la señalización por parte de miembros de la superfamilia de TGF-beta para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso.

## RESUMEN DE LA INVENCION

- 30 El alcance para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

En este sentido, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso en un paciente que lo necesita, donde la composición comprende un anticuerpo anti-ActRIIB. La invención

35 proporciona además el uso de una composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso en un paciente que lo necesita, donde la composición comprende un anticuerpo anti-ActRIIB. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es quimérico. En una realización, el anticuerpo está humanizado. En una realización, el paciente tiene resistencia a la insulina. En una realización, el paciente tiene resistencia a la insulina y trastorno metabólico. En una realización, el anticuerpo

40 inhibe la esteatosis hepática en el paciente tratado. En una realización, la enfermedad del hígado graso es una enfermedad del hígado graso no alcohólica.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar la enfermedad del hígado graso en pacientes mediante el uso de antagonistas de la vía de señalización de ActRIIB. Tales antagonistas pueden ser,

45 por ejemplo, proteínas de ActRIIB solubles (por ejemplo, proteínas de fusión de ActRIIB-Fc), antagonistas que se unen a ActRIIB o inhiben la expresión de ActRIIB y antagonistas que se unen o inhiben la expresión de ligandos que envían señales a través de ActRIIB y participan en la enfermedad del hígado graso. Tales ligandos pueden incluir miostatina, GDF3, activinas, BMP7, BMP2 y BMP4. Como se demuestra en esta invención, las proteínas de fusión de ActRIIB-Fc pueden usarse para disminuir la adiposidad hepática con, en algunos casos, beneficios adicionales tales como una

50 disminución en la resistencia a la insulina o un aumento en la producción de adiponectina. En consecuencia, el antagonismo de la vía de señalización de ActRIIB puede utilizarse para lograr efectos beneficiosos sobre la esteatosis hepática (depósito de lípidos), hipoadiponectinemia, y/o resistencia a la insulina (incluidos, por ejemplo, indicadores de resistencia a la insulina como hiperinsulinemia).

- 55 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para tratar la enfermedad del hígado graso administrando a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido relacionado con ActRIIB. Un polipéptido relacionado con ActRIIB puede ser un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, un dominio extracelular de ActRIIB o porción del mismo) que se une a un ligando de ActRIIB tal como GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, GDF8, GDF11, activina A, activina B o nodal. Opcionalmente, el polipéptido de ActRIIB se une a un ligando de ActRIIB con un Kd
- 60 menor que 10 micromolares o menor que 1 micromolar, 100, 10 o 1 nanomolar. Se ha descrito una variedad de

polipéptidos de ActRIIB adecuados en las siguientes solicitudes de patente PCT publicadas: WO 00/43781, WO 04/039948, WO 06/012627, WO 07/053775, WO 08/097541 y WO 08/109167. Opcionalmente, el polipéptido de ActRIIB inhibe la señalización de ActRIIB, tal como acontecimientos de transducción de señales intracelulares desencadenados por un ligando de ActRIIB. Un polipéptido de ActRIIB soluble para usar en tal preparación puede ser cualquiera de los descritos en esta invención, como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 12 y 14, o que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 12 y 14. Un polipéptido de ActRIIB puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 12 y 14 o una secuencia de la SEQ ID NO: 1, que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 en el extremo carboxílico y que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5 en el extremo amínico. Opcionalmente, los polipéptidos comprenderán un truncamiento con respecto a la SEQ ID NO: 1 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo amínico y de no más de 3 aminoácidos en el extremo carboxílico. Otro polipéptido es el presentado como SEQ ID NO: 12. Un polipéptido de ActRIIB descrito en esta invención puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión al ligando) con respecto a un polipéptido de ActRIIB de origen natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con respecto al polipéptido de ActRIIB de origen natural. Un polipéptido de ActRIIB soluble puede ser una proteína de fusión que tiene, como dominio, un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB o una variante del mismo) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación facilitada, direccionamiento a determinados tejidos, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de estabilidad in vivo, semivida in vivo, captación/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos de proteínas, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Una proteína de fusión de ActRIIB puede incluir un dominio constante de inmunoglobulina, tal como un dominio Fc (tipo natural o mutante) o una seroalbúmina. Una fusión de ActRIIB-Fc comprende un conector relativamente no estructurado situado entre el dominio Fc y el dominio de ActRIIB extracelular. Este conector no estructurado puede corresponder a aproximadamente la región no estructurada de 15 aminoácidos en el extremo carboxílico del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias de repetición y no repetición de treonina/serina y/o glicinas (por ejemplo, TG<sub>4</sub>, TG<sub>3</sub>, SG<sub>4</sub>, SG<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>2</sub>, G). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un epítipo de identificación, un epítipo FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIB soluble incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico. En general, es preferible que una proteína de ActRIIB se pueda expresar en una línea celular de mamífero que media la glucosilación natural de forma adecuada de la proteína de ActRIIB para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Las estirpes celulares humanas y CHO se han usado satisfactoriamente y se espera que otros vectores de expresión de mamífero comunes sean útiles.

En ciertos aspectos, un compuesto descrito en esta invención puede formularse como una preparación farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado con ActRIIB. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de ActRIIB soluble, que no codifica un polipéptido de ActRIIB completo. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido de ActRIIB soluble, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un polipéptido de ActRIIB y una secuencia que codificaría todo o parte del dominio transmembrana y/o del dominio citoplásmico de un polipéptido de ActRIIB, pero para un codón de terminación situado dentro del dominio transmembrana o del dominio citoplasmático, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia completa de polinucleótidos de ActRIIB tal como la SEQ ID NO: 4, o una versión parcialmente truncada, dicho polinucleótido aislado comprende además un codón de terminación de la transcripción de al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o, de otro modo, situado de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una porción truncada de un ActRIIB completo. Otros ácidos nucleicos adecuados que codifican polipéptidos de ActRIIB se muestran como SEQ ID NO: 3 y 15. Los ácidos nucleicos descritos en esta invención se pueden enlazar operativamente a un promotor para la expresión, y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para elaborar un polipéptido de ActRIIB soluble. Tal procedimiento puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 3 o 15) descritos en esta invención en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Tal procedimiento

5 puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de ActRIIB soluble, donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de ActRIIB soluble; y b) recuperar el polipéptido de ActRIIB soluble así expresado. Los polipéptidos de ActRIIB solubles se pueden recuperar como fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas conocidas para la obtención de proteínas a partir de cultivos celulares.

10

En ciertos aspectos, un compuesto descrito en esta invención puede usarse en el tratamiento de una variedad de formas de enfermedad del hígado graso y complicaciones de la misma (por ejemplo, enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad del hígado graso alcohólico, esteatohepatitis alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis), así como trastornos relacionados tales como hipoadiponectinemia, resistencia a la insulina o

15 hiperinsulinemia. Sorprendentemente, como se muestra en esta invención, los polipéptidos de ActRIIB pueden usarse para lograr efectos positivos sobre la enfermedad del hígado graso mientras que tienen un efecto positivo sobre los trastornos relacionados de hipoadiponectinemia y resistencia a la insulina.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona usos de un polipéptido de ActRIIB soluble para elaborar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o enfermedad según se describe en esta invención.

20

En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para tratar la enfermedad del hígado graso en un paciente que lo necesita, y tal método puede comprender administrar una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al

25 menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2 y un polipéptido codificado por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3. El polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende una porción heteróloga. El polipéptido puede ser un dímero. El polipéptido puede fusionarse con un dominio constante de una inmunoglobulina. El polipéptido puede fusionarse con una porción Fc de una inmunoglobulina, tal como una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El polipéptido puede

30 comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109, 29-128, 29-131, 29-134, 25-109, 25-128, 25-131, 25-134 o 20-134 de la SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, 6, 12 o 14. Un paciente que será tratado con tal compuesto puede ser uno que tenga un trastorno descrito en esta invención, que incluye, por ejemplo,

35 enfermedad del hígado graso o una complicación de la misma (por ejemplo, enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad del hígado graso alcohólico, esteatohepatitis alcohólica, fibrosis hepática o cirrosis), hipoadiponectinemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia,

En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para tratar la enfermedad del hígado graso en un

40 paciente que lo necesita, el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la vía de señalización de ActRIIB, ya sea dirigiéndose a ActRIIB o un ligando que envía señales a través de ActRIIB. Los ejemplos de tales compuestos incluyen antagonistas de ActRIIB; antagonistas de la miostatina; antagonistas de la activina A; antagonistas de la activina B; antagonistas de BMP2; antagonistas de BMP4 y antagonistas de GDF3. Los antagonistas de cada uno de los anteriores pueden ser un anticuerpo u otra proteína que se una específicamente a

45 dicha diana e inhiba (por ejemplo, un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal, o un propéptido en el caso de miostatina y GDF3). Los antagonistas de los anteriores también pueden ser un compuesto, tal como un compuesto basado en ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido o ARNi) que inhibe la expresión de ActRIIB o el ligando. Un paciente que será tratado con tal compuesto puede ser uno que tenga un trastorno descrito en esta invención, que incluye, por ejemplo, enfermedad del hígado graso (por ejemplo, enfermedad del hígado graso no

50 alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad del hígado graso alcohólico, esteatohepatitis alcohólica, fibrosis hepática o cirrosis), hipoadiponectinemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia,

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 El archivo de patente o solicitud de patente contiene al menos un dibujo realizado en color. Si se solicitara, y luego de efectuado el pago de la tasa necesaria, la oficina entregará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con el o los dibujos en color.

60 **La Figura 1** muestra la secuencia de aminoácidos sin procesar completa de ActRIIB(25-131)-hFc (SEQ ID NO:14). El líder de TPA (residuos 1-22) y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos naturales 25-131) están cada uno subrayado. Se destaca el glutamato revelado por secuenciación como el aminoácido N-terminal de la proteína de fusión madura.

**La Figura 2** muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(25-131)-hFc (SEQ ID NO:15) (la cadena codificante se muestra en la parte superior y el complemento se muestra en la parte inferior 3'-5'). Están subrayadas las secuencias que codifican el líder de TPA (nucleótidos 1-66) y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 73-396). También se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente para ActRIIB (25-131).

**La Figura 3** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días sobre la esteatosis hepática en un modelo de ratón de obesidad inducida por dieta. Las secciones de hígado (todas mostradas con el mismo aumento) teñidas con Oil Red O revelan una deposición pronunciada de lípidos en condiciones alimentarias ricas en grasas, pero no en condiciones de control. Las flechas indican varias de las muchas gotículas de lípidos densamente empaquetadas, que están teñidas de rojo brillante pero son difíciles de discernir en imágenes en blanco y negro. ActRIIB(25-131)-hFc inhibió la formación de tales gotículas de lípidos y restauró en gran medida la apariencia del tejido hepático a la de los ratones alimentados con la dieta estándar.

**La Figura 4** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días sobre los niveles de ARNm de adiponectina en la grasa blanca epididimal en un modelo de ratón de obesidad inducida por dieta. Los datos de RT-PCR (en unidades relativas, UR), son medias  $\pm$  SEM; n = 7 por grupo; \*, p < 0,05. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, ActRIIB(25-131)-hFc aumentó los niveles de ARNm de adiponectina en más del 60%, contribuyendo así a concentraciones elevadas de adiponectina circulante en estos ratones.

**La Figura 5** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días sobre las concentraciones de adiponectina sérica en un modelo de ratón de obesidad inducida por dieta. Las mediciones de ELISA detectan todas las principales isoformas oligoméricas (adiponectina total) y los datos son medias  $\pm$  SEM., n = 7-8 por grupo; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001. ActRIIB (25-131)-hFc aumentó las concentraciones de adiponectina en circulación en más del 75% en comparación con controles con una dieta rica en grasas e incluso aumentó tales concentraciones significativamente por encima de las observadas en los controles con dieta estándar.

**La Figura 6** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días sobre las concentraciones de insulina sérica en un modelo de ratón de obesidad inducida por dieta. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 7-8 por grupo; \*\*, p < 0,01. ActRIIB(25-131)-hFc revirtió el efecto de una dieta rica en grasas sobre las concentraciones de insulina, lo que indica un aumento de la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana.

**La Figura 7** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc durante 16 semanas sobre la densidad del tejido hepático en un modelo de ratón de aterogénesis, según se determina mediante tomografía microcomputarizada. Los datos (medias  $\pm$  SEM) se expresan en unidades estandarizadas basadas en un valor positivo para el mineral óseo hidroxapatita (HA) y un valor de cero para el agua; por lo tanto, los valores de lípidos son negativos; \*\*, p < 0,01. En comparación con el tratamiento con vehículo en este modelo, ActRIIB(25-131)-mFc aumentó la densidad hepática, lo que indica una reducción significativa en la esteatosis hepática.

## 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 1. Análisis general

La enfermedad del hígado graso abarca un espectro de afecciones hepáticas y generalmente se clasifica como alcohólica o no alcohólica. En cualquier caso, la enfermedad del hígado graso varía desde la esteatosis hepática simple (acumulación y depósito de lípidos) hasta la esteatohepatitis (ASH o NASH), que a menudo progresa a fibrosis hepática, cirrosis y probablemente carcinoma hepatocelular. La enfermedad del hígado graso alcohólico (AFLD) y no alcohólico (NAFLD) son histológicamente indistinguibles; sin embargo, por definición NAFLD se desarrolla en pacientes que consumen poco o nada de alcohol. En cambio, NAFLD se encuentra con frecuencia en personas con obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 y está estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina (Utzschneider y col., 2006, J Clin Endocrinol Metab 91:4753-4761). Con el dramático aumento reciente en la prevalencia de la obesidad y la resistencia a la insulina, NAFLD ha superado la AFLD y la enfermedad hepática inducida por hepatitis viral como la enfermedad hepática crónica más común. Se ha estimado que aproximadamente el 75% de las personas con obesidad tienen NAFLD y hasta un 20% pueden tener NASH (Clark, 2006, J Clin Gastroenterol 40 (Suppl 1):S5-S10; Lazo y col., 2008, Semin Liver Dis 28:339-350).

Ha surgido evidencia de una estrecha relación entre la adiponectina y ambos tipos de enfermedad del hígado graso. La adiponectina, una hormona derivada de la grasa cuya concentración varía inversamente con la masa de tejido adiposo blanco, ejerce importantes acciones de sensibilización a la insulina en los tejidos diana (Yamauchi y col., 2001, Nat Med 7:941-946; Maeda y col., 2002, Nat Med 8:731-737; Kadowaki y col., 2005, Endocr Rev 26:439-451). En diferentes grupos étnicos humanos, el grado de hipoadiponectinemia (concentraciones bajas de adiponectina circulante) se correlaciona aún más estrechamente con la resistencia a la insulina que con la adiposidad (Weyer y col.,

2001, J Clin Endocrinol Metab 86:1930-1935). Además, en ratones obesos, *ob/ob*, la administración de adiponectina mejora la esteatosis hepática y el agrandamiento del hígado (hepatomegalia) (Xu y col., 2003, J Clin Invest 112:91-100). Por último, existe prueba creciente de la desregulación de la señalización de adiponectina mediada por el alcohol (You y col., 2009, Exp Biol Med 234:850-859), y la administración de adiponectina también mejora la esteatosis hepática, la hepatomegalia y la inflamación hepática en un modelo de ratón de AFLD (Xu y col., 2003, J Clin Invest 112:91-100).

Como se describe en los ejemplos, se puede usar una proteína de fusión de ActRIIB-Fc para inhibir la esteatosis hepática (depósito de lípidos), aumentar las concentraciones de adiponectina en suero y normalizar las concentraciones de insulina en suero en un modelo de ratón de obesidad inducida por dieta. Por lo tanto, los agentes derivados de ActRIIB y otros compuestos que inhiben la señalización de ActRIIB se pueden usar para tratar la enfermedad del hígado graso y al mismo tiempo lograr efectos positivos en parte al aumentar las concentraciones de adiponectina circulante y/o disminuir la resistencia a la insulina en los tejidos diana. Los ligandos que se unen a ActRIIB que están implicados en la regulación de la esteatosis hepática, las concentraciones de adiponectina circulante y la resistencia a la insulina incluyen las activinas (por ejemplo, activina A y activina B), miostatina, GDF3, BMP7, BMP2 y BMP4. En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a polipéptidos de ActRIIB. Como se usa en esta invención, el término «ActRIIB» se refiere a una familia de proteínas del receptor de la activina de tipo IIB (ActRIIB) y proteínas relacionadas con ActRIIB, derivadas de cualquier especie. Los miembros de la familia de proteínas de ActRIIB son en general proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad serina/treonina cinasa prevista. El precursor de ActRIIB humano tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, con el péptido señal subrayado, el dominio extracelular indicado en negrita y los posibles sitios de glucosilación ligados a N encuadrados (SEQ ID NO: 2) ( NM\_001106, 512 aa).

MTAPWVALALLWGS**SLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLHC  
**YASWRN**SSGTIELVKKGC**WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCEGNFCNERFTHLPE**  
**AGGPEVTYEP**PPPTAPT**LLTLVLA**YSLLP**IGGLSLIVLLAFW**MYRHRKPPYGHVDIHEDPG  
PPPPSPLVGLKPLQLLEIKAR**GRFGCVWKAQLM**NDFVAVKIFPLQDKQSWQ**SEREIFST**  
 PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMS  
 RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFLAVRFEPGKPPGD  
 THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP  
 FEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG  
 CVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

La secuencia natural anterior, que incluye el líder nativo, se usa a lo largo de esta descripción como la secuencia de bases para numerar los aminoácidos de cualquiera de los diversos truncamientos, formas maduras y variantes de ActRIIB. El término "polipéptido de ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas), que conserva una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tiene una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIB y, opcionalmente, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o una identidad mayor.

En un aspecto específico, la descripción se refiere a polipéptidos de ActRIIB solubles. Como se describe en esta invención, la expresión «polipéptido de ActRIIB soluble» se refiere en general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína de ActRIIB. La expresión "polipéptido ActRIIB soluble", como se usa en esta solicitud, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIB así como cualquier variante de la misma (que incluye mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína de ActRIIB se une a un ligando y es en general soluble. El siguiente es un ejemplo de un polipéptido de ActRIIB soluble (SEQ ID NO: 1) (116 aa).

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLHC**YASWRN**SSGTIELVKKGC**  
**WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCEGNFCNERFTHLPE**AGGPEVTYEP**PPPTAPT**

Otros ejemplos de polipéptidos de ActRIIB solubles comprenden una secuencia señalizadora además del dominio extracelular de una proteína de ActRIIB (véase el ejemplo 1). La secuencia señalizadora puede ser una secuencia señalizadora natural de un ActRIIB, o una secuencia señalizadora de otra proteína, tal como una secuencia

señalizadora del activador del plasminógeno tisular (TPA) o una secuencia señalizadora de melitina de miel de abeja (HBM).

Dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, se han identificado como los receptores de tipo II para las activinas (Mathews y Vale (1991) Cell 65:973-982 y Attisano y col. (1992) Cell 68: 97-108) así como una variedad de otros BMP y GDF. Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF- $\beta$  que incluyen BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita y col., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh y col. (2002) Genes Dev. 16:2749-54). En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también conocido como un ligando de ActRIIB) con un polipéptido de ActRIIB de referencia (p. ej., un polipéptido de ActRIIB soluble). Por lo tanto, las composiciones y procedimientos de la presente descripción son útiles para tratar trastornos asociados con la actividad anormal de uno o más ligandos de receptores ActRIIB. Los ejemplos de ligandos de receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia de TGF- $\beta$ , tales como activina A, activina B, GDF3, Nodal, GDF8 y GDF11.

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

El factor-3 de crecimiento y diferenciación (GDF3), también conocido como 2 relacionado con Vg1, desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario y también se lo ha implicado en la adipogénesis durante la edad adulta. En resumen, la expresión de GDF3 en el tejido adiposo blanco se correlaciona con la masa corporal o la obesidad (Weisberg y col., 2003, J Clin Invest 112: 1796-1808), y la sobreexpresión de GDF3 mediada por adenovirus exagera el aumento de la adiposidad observada en condiciones alimentarias altas en grasa en ratones silvestres (Wang y col., 2004, Biochem Biophys Res Commun 321: 1024-1031). Es importante destacar que los ratones con ablación genética de GDF3 son saludables y esencialmente normales cuando se mantienen con una dieta estándar, pero están protegidos de la obesidad y muestran una tasa metabólica basal aumentada cuando se mantienen con una dieta alta en grasas (Shen et al., 2009, Mol Endocrinol 23: 113-123). Tomados en conjunto, estos hallazgos implican al GDF3 específicamente en la obesidad inducida por dieta y más generalmente en la regulación de la adiposidad.

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y endodermo, así como en la organización posterior de estructuras axiales tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal de un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la placa notocordal y precordal, a la vez que recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar tanto a través de receptores de tipo I como de tipo II y de los efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Los estudios recientes respaldan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma et al., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Se apunta a que los ligandos de Nodal interactúan con sus cofactores (p. ej., cripto) para activar los receptores de la activina de tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos acontecimientos cruciales para el embrión de vertebrado precoz, que incluyen la formación del mesodermo, patrón anterior y especificación del eje izquierda-derecha. Los datos experimentales han demostrado que la transducción de señales de Nodal activa pAR3-Lux, un indicador de luciferasa que se demostró anteriormente que responde específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir pTlx2-Lux, un indicador específicamente sensible a proteínas morfogenéticas óseas. Los resultados recientes proporcionan evidencias bioquímicas directas de que la señalización de Nodal está mediada por la vía de la activina-TGF-beta Smads, Smad2 y Smad3. Las pruebas adicionales han demostrado que la proteína cripto extracelular es necesaria para la transducción de señales de Nodal, lo que la diferencia de la transducción de señales por activina o TGF-beta.

El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8) también se conoce como miostatina. El GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. El GDF8 se expresa altamente en el músculo esquelético en desarrollo y

adulto. La mutación anuladora de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una hipertrofia e hiperplasia marcadas del músculo esquelético (McPherron y col., *Nature*, 1997, 387:83-90). Los aumentos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones naturales de GDF8 en el ganado (Ashmore y col., 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland y Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron y Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; y Kambadur y col., *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en los seres humanos (Schuelke y col., *N Engl J Med* 2004;350:2682-8). Los estudios también han demostrado que la atrofia muscular asociada con infección por VIH en los seres humanos está acompañada de aumentos en la expresión de proteínas GDF8 (Gonzalez-Cadavid y col., *PNAS*, 1998, 95:14938-43). Además, el GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, la creatina cinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos (WO 00/43781). El propéptido de GDF8 se puede unir de forma no covalente al dímero del dominio de GDF8 maduro, al inactivar su actividad biológica (Miyazono y col. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield y col. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654; y Brown y col. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o relacionadas estructuralmente con las proteínas y que inhiben su actividad biológica incluyen folistatina y, potencialmente, proteínas relacionadas con folistatina (Gamer y col. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232).

El factor 11 de crecimiento y diferenciación (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron y col., 1999, *Nat. Genet.* 22: 260-264). El GDF11 se expresa en el brote de la cola, brote de las extremidades, arcos maxilares y mandibulares y ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima y col., 1999, *Mech. Dev.* 80: 185-189). GDF11 desempeña un papel único en la formación del patrón tanto del tejido mesodérmico como del neural (Gamer et al., 1999, *Dev Biol.*, 208:222-32). GDF11 demostró ser un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de las extremidades de polluelos (Gamer et al., 2001, *Dev Biol.* 229:407-20). La expresión de GDF11 en el músculo también apunta a su papel en la regulación del crecimiento muscular de una manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro apunta a que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se encontró que el GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu et al, 2003, *Neuron.* 37:197-207). Por lo tanto, GDF11 puede tener aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere al uso de ciertos polipéptidos de ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles) para antagonizar la señalización de ligandos de ActRIIB generalmente, en cualquier proceso asociado con la actividad de ActRIIB. Opcionalmente, los polipéptidos de ActRIIB de la descripción pueden antagonizar uno o más ligandos de los receptores de ActRIIB, tales como activina A, activina B, GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11, y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales.

Por lo tanto, la presente descripción contempla usar polipéptidos de ActRIIB y antagonistas de ActRIIB o ligandos de ActRIIB para tratar o prevenir enfermedades o afecciones que están relacionadas con la enfermedad del hígado graso. ActRIIB o los ligandos de ActRIIB están involucrados en la regulación de muchos procesos biológicos críticos. Los ejemplos de tales trastornos o afecciones metabólicas relacionados con la enfermedad del hígado graso incluyen, entre otras, enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad del hígado graso alcohólico, esteatohepatitis alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis, hipoadiponectinemia, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Estos trastornos y afecciones se analizan a continuación bajo "Usos terapéuticos ejemplares".

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta descripción y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se describen a continuación o en otra parte de la memoria descriptiva para proporcionar una orientación adicional al facultativo a la hora de describir las composiciones y los procedimientos de la descripción y cómo prepararlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.

«Alrededor de» y «aproximadamente» significarán en general un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Típicamente, los grados ejemplares de error dentro de un 20 por ciento (%), preferiblemente, dentro de un 10 % y, más preferiblemente, dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado de valores.

De forma alternativa y en sistemas biológicos en particular, los términos «alrededor de» y «aproximadamente» pueden significar valores que se encuentran dentro de un orden de magnitud, preferiblemente, dentro de 5 veces y, más preferiblemente, dentro de 2 veces un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en esta invención son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término «aproximadamente» se puede inferir cuando no se indica expresamente.

Los procedimientos de la descripción pueden incluir etapas para comparar secuencias entre sí, que incluyen secuencia de tipo natural de uno o más mutantes (variantes de secuencia). Las comparaciones de este tipo comprenden

típicamente alineamientos de secuencias poliméricas, por ejemplo, al usar programas y/o algoritmos de alineamiento de secuencias que son conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que, en los alineamientos de este tipo, donde una mutación contiene una inserción o eliminación de residuos, el alineamiento de secuencias introducirá un "hueco" (normalmente 5 representado por un guion, o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el residuo insertado o eliminado.

El término "diabetes", como se usa en esta invención, se refiere a diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, también conocida como diabetes tipo II). La diabetes tipo I, o diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), es el resultado de una deficiencia absoluta de insulina, la hormona que regula la utilización de glucosa. La diabetes tipo II, 10 o diabetes insulino dependiente (es decir, diabetes mellitus no insulino dependiente), a menudo ocurre frente a niveles normales o incluso elevados de insulina y parece ser el resultado de la incapacidad de los tejidos para responder adecuadamente a la insulina. La mayoría de los diabéticos tipo II también son obesos.

«Homóloga», en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas 15 que poseen un "origen evolutivo común", lo que incluye proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, como refleja su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

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

Sin embargo, en el uso habitual y en la presente solicitud, el término «homóloga», cuando está modificado con un 25 adverbio tal como «muy», se puede referir a similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.

## 2. Polipéptidos de ActRIIB

30 En ciertos aspectos, la descripción se refiere a polipéptidos variantes de ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles). Opcionalmente, los fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas tienen actividades biológicas similares o iguales que sus correspondientes polipéptidos de ActRIIB naturales. Por ejemplo, una variante de ActRIIB de la descripción se puede unir e inhibir la función de un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina E, GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, Nodal, GDF8 o GDF11) Opcionalmente, un polipéptido 35 de ActRIIB modula el crecimiento de tejidos tales como grasa, músculo, hueso o cartílago. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIB incluyen el polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) y polipéptidos de ActRIIB solubles humanos (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 5, 6, 12 y 14).

La descripción identifica porciones y variantes de ActRIIB activas funcionalmente. Los solicitantes han comprobado 40 que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia descrita por Hilden y col. (Blood. 15 de abril de 1994;83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición que corresponde al aminoácido 64 de la SEQ ID NO: 2 (A64), tiene una afinidad relativamente baja para la activina y GDF11. Por el contrario, la misma proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad para la activina y GDF11 en el intervalo de nanomolar bajo y picomolar alto. Por lo tanto, una secuencia con un R64 se usa como la secuencia de referencia de tipo natural para ActRIIB humano 45 en esta descripción.

Attisano y col. (Cell. 10 de enero de 1992; 68(1):97-108) demostraron que una eliminación del nudo de prolina en el extremo carboxílico del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor para activina. Una proteína de 50 fusión de ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 2, "ActRIIB (20-119)-Fc", ha reducido la unión a GDF11 y a activina con respecto a un ActRIIB (20-134)-Fc, que incluye la región de nudo de prolina y el dominio yuxtamembrana completo. Sin embargo, una proteína de ActRIIB (20-129)-Fc conserva una actividad similar pero un poco reducida con respecto al tipo natural, incluso aunque se perturbe la región de nudo de prolina. Por tanto, los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 se espera que estén todos activos, pero las construcciones que se detienen en 134 o 133 pueden estar más activas. De forma similar, 55 no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por un margen grande. Para respaldar esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, un polipéptido de la proteína de fusión de ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión reducida al ligando. El aminoácido 119 está mal conservado y, por tanto, se altera o trunca fácilmente. Las 60 formas que terminan en 128 o más adelante conservan la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Puede ser deseable usar cualquiera de estas formas, en función del entorno clínico o experimental.

En el extremo amínico de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes conserve la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glucosilación con enlaces N-glucosídicos sin afectar sustancialmente a la unión al ligando. Esto confirma que se toleran bien las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señalizador y la región reticulada de la cisteína, que se corresponde con los aminoácidos 20-29. En particular, se espera también que las construcciones que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 conserven su actividad, y las construcciones que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 también conserven la actividad.

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

La descripción incluye los resultados de un análisis de estructuras de ActRIIB compuestas que demuestran que la bolsa de unión a ligando se define mediante los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92, y E94 a F101. En estas posiciones, se espera que se toleren mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus* y, por lo tanto, se tolerarán aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H en esta posición. Por consiguiente, una fórmula general para una proteína variante de ActRIIB es una que comprende aminoácidos 29-109, pero que opcionalmente comienza en una posición que varía de 20-24 o 22-25 y que termina en una posición que varía de 129-134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios de aminoácidos conservadores en la bolsa de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 en la bolsa de unión al ligando. Tal proteína puede retener más del 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 2. Los sitios fuera de la bolsa de unión, en los que la variabilidad se puede tolerar particularmente bien, incluyen los términos amino y carboxi del dominio extracelular (como se indicó anteriormente) y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) mejora en realidad la unión al ligando en el fondo de A64 y, por tanto, se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión al ligando en el fondo de R64. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 en el fondo de A64, lo que demuestra que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por tanto, se puede tolerar otro residuo básico, tal como H, en la posición 64.

ActRIIB se conserva bien en prácticamente todos los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular conservados completamente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están muy conservados. Por consiguiente, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan una idea de los residuos que se pueden alterar. Por lo tanto, una variante de ActRIIB humano activo puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIB de vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de otra secuencia humana o de otros vertebrados. Los ejemplos siguientes ilustran esta estrategia para definir una variante de ActRIIB activa. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus* y, por tanto, esta posición se puede alterar y, opcionalmente se puede alterar a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo apolar tal como A. E52 es una K en *Xenopus*, lo que indica que este punto puede tolerar un amplio abanico de cambios, que incluyen residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, con los residuos polares favorecidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e y. F108 es una Y en *Xenopus* y, por lo tanto, se debería tolerar Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L. F111 es K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán residuos cargados en esta posición, lo que incluye D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que se toleran residuos básicos en esta posición, lo que incluye R y H. A en la posición 119 está relativamente mal conservada y se presenta como P en roedores y V en *Xenopus*, por tanto, se debería tolerar esencialmente cualquier aminoácido en esta posición.

La descripción demuestra que la adición de otro sitio de glucosilación con enlaces N-glucosídicos (N-X-S/T) aumenta la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, con respecto a la forma ActRIIB (R64)-Fc. Mediante la introducción de una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia de NXT que confiere una semivida más larga. Se encontraron otras secuencias de NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque los últimos pueden no glucosilarse eficientemente con el R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T se pueden introducir generalmente en posiciones fuera de la bolsa de unión al ligando. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134

o 129-134. Las secuencias de N-X-S/T también se pueden introducir en el enlazador entre la secuencia de ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Se puede introducir un sitio de este tipo con el mínimo esfuerzo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o introduciendo de un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearía un sitio de glicosilación con enlaces N-glicosídicos son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinada con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se predice que está glicosilado se puede alterar a un T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección permitida por la glicosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que está glicosilado se puede alterar a un S. Por tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Del mismo modo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. En consecuencia, una variante de ActRIIB puede incluir una o más secuencias de consenso de glicosilación unidas por enlaces N-glicosídicos no endógenos adicionales.

La posición L79 puede alterarse para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF11) alteradas L79A o L79P reduce la unión a GDF11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D conserva la unión a GDF11. De forma notable, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión a activina. Los experimentos in vivo indican que estos receptores que no son de activina conservan una capacidad significativa para aumentar la masa muscular, pero muestran menos efectos en otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad para obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina.

Las variaciones descritas se pueden combinar de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descrito en esta invención indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que a menudo es beneficioso conservar. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), posición 78 (hidrófobo y, en particular, triptófano), posición 37 (ácido y, en particular, ácido aspártico o glutámico), posición 56 (aminoácido básico), posición 60 (aminoácido hidrófobo, en particular, fenilalanina o tirosina).

Así, en cada una de las variantes descritas en esta solicitud, la descripción proporciona una estructura de aminoácidos que se puede conservar. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargada, en particular, E, D, R o K).

Se pueden obtener fragmentos aislados de los polipéptidos de ActRIIB al seleccionar polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 4 y 15). Además, se pueden sintetizar químicamente fragmentos usando técnicas conocidas en la técnica, tales como síntesis química con f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos se pueden producir (de forma recombinante o por síntesis química) y someter a prueba para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína de ActRIIB o un ligando de ActRIIB.

Una variante funcional de los polipéptidos de ActRIIB puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 4 y 10. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 12 y 14.

La presente descripción contempla la elaboración de variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido de ActRIIB para fines tales como mejorar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ejemplo, el tiempo de conservación ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Los polipéptidos de ActRIIB modificados se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, eliminación o adición aminoacídica. Por ejemplo, es razonable esperar que un remplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un remplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente (p. ej., mutaciones conservativas) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ActRIIB produce un homólogo funcional al evaluar la capacidad del polipéptido de ActRIIB variante de producir una respuesta en las células de una manera similar al polipéptido de ActRIIB de tipo natural, o de unirse a uno o más ligandos, tales como activina, BMP7, GDF3, BMP2, BMP4, GDF-11, o miostatina de manera similar al tipo natural.

La presente descripción contempla mutaciones específicas de polipéptidos de ActRIIB para alterar la glicosilación del polipéptido. Los sitios de glicosilación ejemplares en los polipéptidos de ActRIIB se ilustran en la SEQ ID NO: 2. Tales mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación unidos por enlaces N-glicosídicos u O-glicosídicos. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina comprenden en general una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina/serina (donde "X" es cualquier aminoácido) que reconoce específicamente enzimas de glicosilación celular apropiadas. La modificación también se

puede realizar mediante la adición, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido de ActRIIB de tipo natural (para sitios de glucosilación unidos por enlaces O-glucosídicos). Una variedad de sustituciones o deleciones de amino ácidos en una o ambas de las primeras o terceras posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) da lugar a la

5 ausencia de glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otros medios para aumentar el número de restos de carbohidrato en un polipéptido ActRIIB es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRIIB. En función del modo de acoplamiento usado, el uno o más glúcidos se pueden fijar a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o

10 (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306. La eliminación de uno o más restos de carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIB se puede realizar químicamente y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, exponer el polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor

15 parte o la totalidad de los glúcidos a excepción del glúcido enlazador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) a la vez que deja la secuencia de aminoácidos intacta. La desglucosilación química se describe además en Hakimuddin y col. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y en Edge y col. (1981) *Anal. Biochem.* 118:131. La escisión enzimática de los restos carbohidrato en polipéptidos de ActRIIB se puede lograr mediante el uso de un abanico de endo- y exoglucosidasas como describen Thotakura y col. [*Meth. Enzymol.* (1987) 138:350]. La secuencia de un polipéptido

20 de ActRIIB se puede ajustar, según proceda, en función del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto o vegetales pueden introducir patrones de glucosilación diferentes que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas de ActRIIB para su uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glucosilación adecuada, tal como las estirpes celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras estirpes celulares de expresión de mamíferos sean

25 útiles también.

Esta descripción contempla además un procedimiento para generar variantes, en particular, conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido de ActRIIB, que incluyen, opcionalmente, variantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito de

30 seleccionar tales colecciones combinatorias puede ser de generar, por ejemplo, variantes de polipéptido de ActRIIB que tienen propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada o unión a ligando alterada. A continuación, se proporciona una variedad de ensayos de cribado, y se pueden usar tales ensayos para evaluar las variantes. Por ejemplo, se puede seleccionar una variante del polipéptido de ActRIIB para unirse a un polipéptido de ActRIIB, para evitar la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido de ActRIIB.

35 La actividad de los polipéptidos de ActRIIB o o sus variantes también se puede ensayar en un ensayo a base de células o in vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido de ActRIIB en la expresión de genes implicados en la diferenciación o función de los adipocitos (por ejemplo, adiponectina). Según sea necesario, esto se puede llevar a cabo en presencia de una o más proteínas del ligando de ActRIIB recombinantes (por ejemplo,

40 activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido de ActRIIB y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRIIB. Del mismo modo, se puede administrar un polipéptido de ActRIIB a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más propiedades de hepatocitos o adipocitos (tales como la expresión del gen de la adiponectina). De manera similar, la actividad de un polipéptido de ActRIIB o sus variantes se puede probar en adipocitos, células musculares, células óseas y células neuronales para determinar cualquier efecto sobre el

45 crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los ensayos que se describen a continuación. Tales ensayos son conocidos y rutinarios en la técnica. Se puede usar un gen indicador que responde a SMAD en tales estirpes celulares para controlar los efectos sobre la señalización posterior.

Se pueden generar variantes derivadas combinatoriamente que tienen una potencia selectiva en relación con un

50 polipéptido de ActRIIB natural. Las variantes de proteínas de este tipo, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, se pueden usar en protocolos de genoterapia. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares dramáticamente diferentes que el correspondiente polipéptido ActRIIB de tipo natural. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que provocan la destrucción de, o la inactivación de otra forma de,

55 un polipéptido ActRIIB nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de los polipéptidos ActRIIB modulando la semivida de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles del polipéptido de ActRIIB recombinante dentro de la célula.

60 Los polipéptidos de ActRIIB de la descripción pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera de las que están naturalmente presentes en los polipéptidos de ActRIIB. Tales modificaciones incluyen, entre otras, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los

- polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido de ActRIIB se pueden ensayar como se describe en para otras variantes del polipéptido de ActRIIB. Cuando se produce un polipéptido ActRIIB en las células al escindir una forma naciente del polipéptido
- 5 ActRIIB, el procesamiento post-traduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen mecanismos celulares específicos y característicos para las actividades postraduccionales de este tipo y se pueden elegir para garantizar la modificación y procedimiento correctos de los polipéptidos de ActRIIB.
- 10 En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos conocidos de los dominios de fusión de este tipo incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. Se puede seleccionar un dominio
- 15 de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Con fines de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con parejas de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, se
- 20 puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIB. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP), así como las "etiquetas de epítomos", que son normalmente secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Los epítomos de identificación conocidos para los que anticuerpos monoclonales específicos están disponibles fácilmente incluyen marcadores FLAG, marcadores de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y de c-myc. En algunos casos, los dominios
- 25 de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como el Factor Xa o la Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, de este modo, libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas se pueden aislar a continuación del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. Un polipéptido ActRIIB se puede fusionar con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizante"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida sérica,
- 30 independientemente de si esto se debe a una destrucción disminuida, un aclaramiento disminuido por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Se conoce que las fusiones con la parte Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una
- 35 función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento muscular).

Como ejemplo específico, la presente descripción proporciona una proteína de fusión como un antagonista de BMP7 que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, de unión a BMP7) fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 13).

40

```

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD (A) VSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSGDGPFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

```

- Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en los residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265)
- 45 tiene una capacidad reducida para unirse a los receptores Fcγ con respecto a un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) tiene una capacidad aumentada para unirse al receptor Fc relacionado a la clase I de MHC (FcRN) con respecto a un dominio Fc de tipo natural.
- 50 Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB puede situarse en el extremo carboxílico con respecto a un dominio heterólogo, o, de forma alternativa, un dominio heterólogo se puede situar en el extremo carboxílico con respecto a un polipéptido de ActRIIB. El dominio de polipéptido de ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de
- 55 aminoácidos adicionales en el extremo carboxílico o amínico en cualquier dominio o entre los dominios.

Los polipéptidos de ActRIIB de la presente descripción pueden contener una o más modificaciones que son capaces

de estabilizar los polipéptidos de ActRIIB. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida in vitro de los polipéptidos de ActRIIB, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos de ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de ActRIIB. Tales modificaciones estabilizantes incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizante), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIB), y modificaciones del resto de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidrato de un polipéptido ActRIIB). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona a un dominio estabilizante tal como una molécula de IgG (p. ej., un dominio Fc). Como se usa en esta invención, la expresión "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de carbohidrato o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

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

Los polipéptidos de ActRIIB (modificados o no modificados) de la descripción pueden producirse por una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales polipéptidos de ActRIIB se pueden sintetizar usando técnicas de química proteica estándar, tales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, los sintetizadores de péptidos automatizados se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, Advanced Chemtech Modelo 396; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, los polipéptidos ActRIIB, fragmentos o variantes de los mismos se pueden producir de forma recombinante usando diversos sistemas de expresión (p. ej., E. coli, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus), como se conoce en la técnica (véase también a continuación). Los polipéptidos ActRIIB modificados o no modificados se pueden producir mediante digestión de polipéptidos ActRIIB de longitud completa producidos de forma recombinante mediante el uso de, por ejemplo, una proteasa, p. ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, enzima de conversión de aminoácidos básicos emparejados (PACE). Se puede usar análisis por ordenador (usando un software disponible comercialmente, p. ej., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar los sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, tales polipéptidos ActRIIB se pueden producir a partir de polipéptidos ActRIIB de longitud completa producidos de forma recombinante tales como técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mediante escisión química (p. ej., bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

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

En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles), incluida cualquiera de las variantes descritas en esta invención. Por ejemplo, la siguiente secuencia codifica un polipéptido precursor de ActRIIB humano natural (SEQ ID NO: 4) (nucleótidos 5-1543 de NM\_001106, 1539 bp):

## ES 2 869 864 T3

atgacggcgccctgggtggccctgcgccctcctctggggatcgctgtggccccgctctgg  
gcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagc  
gcaccaaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgc  
tacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggctgctggct  
agatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagg  
tgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttcaactcatttgccagag  
gctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccaccctgctcaecggt  
gctggcctactcaactgctgccatcgggggcctttccctcatcgtcctgctggcctttt  
ggatgtaccggcatcgcaagccccctacggtcacgtgtggacatccatgaggaccctggg  
cctccaccaccatccccctctggtgggctgaagccactgcagctgctggagatcaaggc  
tcgggggagcctttggctgtgtctggaaggcccagctcatgaatgactttgtagctgtca  
agatcttcccactccaggacaagcagtcgtggcagagtgaacgggagatcttcagcaca  
cctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcattgctgccgagaagcgaggctccaa  
cctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggatt  
acctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtca  
cgaggcctctcatacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgaggggccacaagcc  
gtctattgccacagggactttaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacag  
ccgtgctggctgactttggcttggctgttcgatttgagccagggaaacctccaggggac  
accacggacaggtaggcacgagacgggtacatggctcctgaggtgctcgagggagccat  
caacttccagagagatgccttctgctgcatgacatgtatgccatgggggtgggtgctgt  
gggagcttgtgtctcgtgcaaggctgcagacggacccgtggatgagtacatgctgcc  
tttgaggaagagattggccagcacccttcgttggaggagctgcaggaggtgggtgca  
caagaagatgagggccaccattaaagatcactgggtgaaacacccgggctggcccagc  
tttgctgaccatcgaggagtgtgggaccatgatgcagaggctcgttgtccggggc  
tgtgtggaggagcgggtgtccctgattcggaggtcggtaacggcactacctggactg  
tctcgtttccctgggtgacctctgtcaccaatgtggacctgccccctaaagagtcaagca  
tctaa

La siguiente secuencia codifica un polipéptido de ActRIIB soluble (extracelular) humano (SEQ ID NO: 3) (348 pb).

tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagct  
ggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgc  
actgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggctgc  
tggttagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaaccc  
ccaggtgacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttcaactcatttgc  
cagaggctgggggcccgggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccacc

5

Los ácidos nucleicos de referencia pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para preparar polipéptidos de ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en una estrategia de genoterapia).

10

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

15

La descripción proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que pueden ser al menos 80%,

85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 3. Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 3, y las variantes de la SEQ ID NO: 3 también están dentro del alcance de esta descripción. Las secuencias de ácidos nucleicos de la descripción se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una genoteca.

5

Los ácidos nucleicos de la descripción también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente restrictivas con la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 3, la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 3 o fragmentos de las mismas. Como se comentó anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación de ADN se pueden variar. Un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación de ADN se pueden variar. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C hasta una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede aumentar de condiciones de rigurosidad baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de rigurosidad alta a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras se cambia la otra variable. La descripción proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de astringencia baja de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

20

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

30

Los ácidos nucleicos recombinantes de la descripción se pueden unir operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula hospedadora usada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para un abanico de células hospedadoras. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, puntos de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. La descripción contempla los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión se puede insertar en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son muy conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.

45

En ciertos aspectos de la descripción, el ácido nucleico de referencia se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ActRIIB y unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras se reconocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de ActRIIB. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a la misma en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ActRIIB. Las secuencias de control de la expresión útiles de este tipo incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la ARN polimerasa T7, las principales regiones promotoras y operadoras del fago lambda, las regiones de control de la proteína de la envoltura de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento  $\alpha$  de la levadura, el promotor del poliedro del sistema del baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos. Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula

60

hospedadora que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Asimismo, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores de antibióticos.

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

- Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG,  
15 pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (VPB-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) se pueden usar para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas.  
20 Los ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (lo que incluye los retrovíricos) se pueden encontrar más adelante en la descripción de sistemas de administración de genoterapia. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son muy conocidos en la técnica. Para consultar otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2.<sup>a</sup> ed., ed. por Sambrook,  
25 Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), capítulos 16 y 17. En algunos aspectos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tal como el pBlueBac III que contiene  $\beta$ -gal).

- 30 Se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos de ActRIIB de referencia en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, California, EE. UU.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise.). Como resultará evidente, las construcciones genéticas de referencia se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos de ActRIIB de referencia en células propagadas en  
35 cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, lo que incluye proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

- Esta descripción se refiere también a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) para uno o más de los polipéptidos de ActRIIB de referencia. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB de la  
40 descripción puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), células de levadura o de mamífero. Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas.

- En consecuencia, la presente descripción se refiere además a procedimientos de producción de los polipéptidos de  
45 ActRIIB de referencia. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRIIB se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido de ActRIIB. El polipéptido ActRIIB se puede secretar y aislar de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB se puede retener citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recoger, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped,  
50 medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular se conocen en la técnica. Los polipéptidos ActRIIB objetivo se pueden aislar del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIB. El polipéptido de ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio  
55 que facilita su purificación.

- En otro aspecto, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de un sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo amínico de la porción deseada del polipéptido de ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad  
60 usando una resina metálica de  $Ni^{2+}$ . La secuencia líder de purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido de ActRIIB purificado (por ejemplo, véase Hochuli y col., (1987) J. Chromatography 411:177 y Janknecht y col., PNAS EE. UU. 88:8972).

Las técnicas para fabricar genes de fusión son muy conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o irregulares para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según proceda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseables y ligadura enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluidos sintetizadores de ADN automatizados. De forma alternativa, la amplificación mediante PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente se pueden hibridar para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

#### 4. Anticuerpos y otros antagonistas

Otro aspecto de la divulgación se refiere a los anticuerpos y otros antagonistas, incluidas las proteínas que se unen a las dianas descritas en esta invención y los ácidos nucleicos que inhiben la expresión de las dianas descritas en esta invención. Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB soluble) y que se une competitivamente con el polipéptido de ActRIIB puede usarse como un antagonista de las actividades del polipéptido de ActRIIB. Por ejemplo, al usar inmunógenos derivados de un polipéptido de ActRIIB, los anticuerpos antisuero o monoclonales antiproteína/antipeptido pueden elaborarse mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. de Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, hámster o conejo, puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido o ligando de ActRIIB, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o un péptido incluyen la conjugación a vehículos u otras técnicas muy conocidas en la técnica. Se puede administrar una porción inmunogénica de un polipéptido o ligando de ActRIIB en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede supervisar mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Se puede usar ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Después de la inmunización de un animal con un preparado antigénico de un polipéptido o ligando de ActRIIB, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un animal inmunizado y fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizantes, tales como células de mieloma, para producir células de hibridoma. Tales técnicas son muy conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridomas (originalmente desarrollada por Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbar y col., 1983, *Immunology Today*, 4:72), y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. págs. 77-96). Las células de hibridoma se pueden seleccionar inmunquímicamente para la producción de anticuerpos reactivos específicamente con un polipéptido de ActRIIB y aislar los anticuerpos monoclonales de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

El término «anticuerpo» tal como se usa en esta invención pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido o ligando de ActRIIB de referencia. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos seleccionarse respecto a su utilidad de la misma manera que se ha descrito anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos de F(ab)<sub>2</sub> al tratar el anticuerpo con pepsina. El fragmento de F(ab)<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. Se pretende además que el anticuerpo incluya moléculas biespecíficas, de cadena única y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido de ActRIIB conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. El anticuerpo comprende además un marcador fijado al mismo y capaz de ser detectado (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático).

Un anticuerpo de la descripción puede ser un anticuerpo monoclonal, y la descripción puede poner a disposición procedimientos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un procedimiento para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido o ligando de ActRIIB puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido o ligando de ActRIIB eficaz para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obtener células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y ensayar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido o ligando de ActRIIB. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido o ligando de ActRIIB. El anticuerpo monoclonal puede purificarse del cultivo celular.

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

Además, las técnicas usadas para seleccionar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unir un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión en solución. Se dispone de un abanico de técnicas diferentes para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de tipo sándwich (por ejemplo, el sistema de esferas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunoelctrotransferencias, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona anticuerpos que se unen a un polipéptido o ligando de ActRIIB soluble. Tales anticuerpos se pueden generar de forma muy similar a la descrita anteriormente, usando un polipéptido o ligando de ActRIIB soluble o un fragmento del mismo como un antígeno. Se pueden usar anticuerpos de este tipo, por ejemplo, para detectar polipéptidos de ActRIIB en muestras biológicas y/o para monitorear los niveles de polipéptido de ActRIIB soluble en un individuo. En ciertos casos, se puede usar un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido o ligando de ActRIIB soluble para modular la actividad de un polipéptido de ActRIIB y/o un ligando de ActRIIB, que trata así la enfermedad del hígado graso.

Ciertos ligandos, tales como miostatina y GDF3, pueden inhibirse usando un polipéptido que comprende una porción de unión del propéptido respectivo, o una variante del mismo. Tales propéptidos se pueden preparar como proteínas de fusión, incluidas proteínas de fusión Fc. Se describen ejemplos de propéptidos adecuados en las solicitudes de patente publicadas WO 02/085306 y WO 06/002387.

Además, se pueden usar otras proteínas de unión, tales como las llamadas «trampas» (por ejemplo, folistatina, FLRG, FSTL, Cerberus y Coco), receptores de tipo I soluble, por ejemplo, ALK-7. Se pueden encontrar ejemplos de tales polipéptidos en las solicitudes de patente publicadas WO 05/115439, WO 08/109779, WO 08/067480, WO 07/109686, WO 05/100563, y WO 05/025601.

Se pueden usar ácidos nucleicos, tales como sondas antisentido o ARNi (que pueden incluir nucleótidos tanto naturales como no naturales) para inhibir la expresión de ActRIIB o cualquiera de los ligandos tratados en esta invención.

#### 5. Ensayos de selección

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere al uso de los polipéptidos de ActRIIB de referencia (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos de ActRIIB. Los compuestos identificados a través de esta selección pueden probarse en tejidos como grasa, músculos, huesos, cartílagos y/o neuronas, para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido in vivo. Opcionalmente, estos compuestos se pueden probar adicionalmente en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento tisular in vivo.

Existen numerosas estrategias para seleccionar agentes terapéuticos para modular el crecimiento tisular al dirigirse a los polipéptidos de ActRIIB. Se puede realizar una selección de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB sobre el crecimiento de grasa, músculo, hueso, cartílago, y/o neuronas. El ensayo se lleva a cabo para seleccionar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su compañero de unión, tal como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, BMP7, Nodal, GDF8, o GDF11). De forma alternativa, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido de ActRIIB a su proteína de unión tal como un ligando de ActRIIB. Los compuestos se pueden identificar por su capacidad de interactuar con un polipéptido de ActRIIB.

Bastará un abanico de formatos de ensayo y, a la vista de la presente descripción, aquellos no descritos expresamente

en esta invención serán comprendidos, no obstante, por un experto en la técnica. Como se describe en esta invención, los compuestos de ensayo (agentes) de la descripción se pueden crear mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos de referencia pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) que se van a someter a prueba para detectar su capacidad para actuar  
5 como moduladores de crecimiento de tejidos se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), se pueden producir químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, que incluyen peptidomiméticos) o se pueden producir de forma recombinante. Los compuestos de ensayo contemplados por la presente descripción incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, glúcidos, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de ensayo es una molécula orgánica  
10 pequeña que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 daltons.

Los compuestos de ensayo de la descripción se pueden proporcionar como entidades únicas y discretas o como colecciones de mayor complejidad, tal como fabricadas mediante química combinatorio. Estas colecciones pueden comprender, por ejemplo, glúcidos, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de  
15 compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser de forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de cribado. Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar opcionalmente con otros compuestos y tienen grupos de derivatización que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitativos de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, microesferas magnéticas, glutatión S  
20 transferasa (GST), agentes de reticulación fotoactivable o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de selección de fármacos que prueban colecciones de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento con el fin de maximizar el número de compuestos estudiados en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas exentos de células, tales como los que se pueden  
25 derivar con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como cribados "principales", ya que se pueden generar para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de la toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba se pueden ignorar en general en el sistema in vitro, en su lugar, el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como se puede manifestar en una alteración  
30 de la afinidad de unión entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión (por ejemplo, un ligando de ActRIIB).

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado ejemplar de la presente descripción, el compuesto objetivo se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que habitualmente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. Se le añade a continuación la mezcla del compuesto y  
35 el polipéptido ActRIIB a una composición que contiene un ligando de ActRIIB. La detección y cuantificación de complejos de ActRIIB/ligando de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto se puede evaluar mediante la generación de curvas de respuesta a la dosis a partir de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, un ensayo de control también se puede realizar  
40 para proporcionar un valor de referencia para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido de ActRIIB y se cuantifica la formación de complejo de ActRIIB/ligando de ActRIIB en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos se puede variar, y se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos celulares y lisados para conseguir un sistema de ensayo  
45 extracelular adecuado.

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

La presente descripción contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, ya sea directa o indirectamente, del grado de  
55 interacción entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de onda ópticas (la publicación PCT WO 96/26432 y la patente de los Estados Unidos n.º 5.677.196), la resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga de superficie y sensores de fuerza de superficie, son compatibles con muchos aspectos de la descripción.

60 Además, la presente descripción contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el «ensayo de dos híbridos», para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.283.317; Zervos y col. (1993)

Cell 72:223-232; Madura y col. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel y col. (1993) Biotechniques 14:920-924 y Iwabuchi y col. (1993) Oncogene 8:1693-1696). La presente descripción contempla el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, pequeñas moléculas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 5 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81 y las patentes de Estados Unidos n.º 5.525.490; 5.955.280 y 5.965.368.

Los compuestos de referencia pueden ser identificados por su capacidad para interactuar con un polipéptido de ActRIIB de la descripción. La interacción entre el compuesto y el polipéptido de ActRIIB puede ser covalente o no 10 covalente. Por ejemplo, tal interacción se puede identificar a nivel proteico usando procedimientos bioquímicos in vitro, que incluyen fotorreticulación, unión a ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad [Jakoby WB y col. (1974) Methods in Enzymology 46:1]. En ciertos casos, los compuestos se pueden examinar en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o en fase líquida. De forma alternativa, el gen que codifica un polipéptido 15 ActRIIB se puede transfectar con un sistema indicador (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o la proteína fluorescente verde) en una célula y se puede cribar contra la colección preferiblemente mediante un cribado de alta capacidad o con miembros individuales de la colección. Se pueden usar ensayos de unión basados en otro mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, esfera o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por 20 electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar en general mediante resonancia colorimétrica o de fluorescencia o de plasmón superficial.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona procedimientos y agentes para regular la señalización de adiponectina, la resistencia a la insulina y la obesidad.

25 Se entiende que los ensayos de selección de la presente divulgación se aplican no solo a los polipéptidos de ActRIIB de referencia y variantes de los polipéptidos de ActRIIB, sino también a cualquier compuesto de prueba, incluidos los agonistas y antagonistas de los polipéptidos de ActRIIB o la señalización de ActRIIB. Además, estos ensayos de selección son útiles para la verificación del fármaco diana y el control de calidad.

## 30 6. Usos terapéuticos ejemplares

Las composiciones (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB) de la presente descripción se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o afección que se asocia con la enfermedad del hígado graso. La presente descripción 35 proporciona procedimientos para el tratamiento o prevención de un individuo que lo necesite mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de ActRIIB como se describe anteriormente. Estos procedimientos están particularmente dirigidos a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales y, más particularmente, de seres humanos.

40 Como se usa en esta invención, un agente terapéutico que «previene» un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con respecto a la muestra de control no tratada. El término «tratar», como se usa en esta invención, incluye la profilaxis de la afección identificada o mejora o eliminación de la afección una vez que se ha 45 establecido.

Como se demuestra en esta invención, ActRIIB-Fc promueve la expresión de adiponectina mediante adipocitos blancos, aumenta la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana e inhibe la esteatosis hepática. Por consiguiente, las composiciones descritas en esta invención pueden usarse para tratar una variedad de trastornos, tales como 50 enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad del hígado graso alcohólico, esteatohepatitis alcohólica, fibrosis hepática y cirrosis.

Las composiciones (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB solubles) de la divulgación pueden usarse para inhibir la esteatosis hepática. Este efecto puede ir acompañado de un efecto de promover mayores concentraciones de 55 adiponectina circulante y/o provocar un aumento de la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana. La función de bloqueo o antagonismo de uno o más ligandos de ActRIIB in vivo puede inhibir eficazmente la esteatosis hepática y, por tanto, tratar afecciones en las que no es deseada. Este enfoque está confirmado y respaldado por los datos que se muestran en esta invención, mediante los cuales se demostró que una proteína de ActRIIB-Fc aumenta la expresión adipocítica de adiponectina, aumenta las concentraciones de adiponectina circulante, reduce las concentraciones de 60 insulina circulante coherente con una mayor sensibilidad a la insulina, produce cambios beneficiosos en el perfil de lípidos séricos, mejora la composición corporal y previene la esteatosis hepática.

## 7. Composiciones farmacéuticas

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

El procedimiento terapéutico de la invención puede incluir la administración de la composición tópica, sistémica o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Además, la composición se puede encapsular o inyectar deseablemente en una forma viscosa para su administración a un sitio de tejido diana (p. ej., hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo, un sitio que tiene un daño tisular. La administración tópica puede ser adecuada para curar heridas y reparar tejidos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos de ActRIIB, que también se pueden incluir opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, se pueden administrar de forma simultánea o secuencial con los compuestos de referencia (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB) en los procedimientos de la descripción.

Las composiciones de la presente descripción pueden incluir una matriz que puede entregar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB) a un sitio de tejido diana, proporcionando una estructura para el tejido que se desarrolla y que es óptimamente capaz de reabsorberse en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos de ActRIIB. Las matrices de este tipo pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones objetivo definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatito, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Matrices adicionales están comprendidas por proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos anteriormente mencionados de material, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Puede alterarse la composición de biocerámicas, tal como en aluminato-fosfato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

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

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

Las formas de dosificación líquida para administración por vía oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes que se usan comúnmente en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo,

acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isostearílicos etoxilados, polioxitileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

10

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

15

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, amortiguador o propelente que sea necesario. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto de referencia de esta descripción (por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc o mezclas de estos.

20

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

25

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

30

Las composiciones de la descripción también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenólico sódico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como glúcidos, cloruro de sodio y similares. Asimismo, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monostearato de aluminio y gelatina.

35

Se entiende que la pauta de dosificación será determinada por el médico especialista al considerar diversos factores que modifican la acción de los compuestos de referencia de la descripción (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB). Los diversos factores dependerán de la enfermedad por tratar.

40

La presente descripción también proporciona terapia génica para la producción in vivo de polipéptidos de ActRIIB u otros compuestos descritos en esta invención. Tal terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de ActRIIB en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente.

45

La administración de secuencias de polinucleótidos ActRIIB se puede lograr usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere el uso de liposomas dirigidos para la entrega terapéutica de secuencias de polinucleótidos de ActRIIB.

50

- Diversos vectores virales que pueden usarse para la genoterapia como se enseña en esta invención incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o un ARN viral tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Diversos vectores retrovéricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de manera que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovéricos se pueden hacer específicos de la diana fijando, por ejemplo, un glúcido, un glucolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unir a una envoltura viral para permitir la administración específica dirigida del vector retroviral que contiene el polinucleótido de ActRIIB. El vector se puede dirigir a células/tejidos de huesos, cartílagos, músculos o neuronas.
- 15 Alternativamente, se pueden transfectar directamente células de cultivo tisular con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gaga, pol y env mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectan a continuación con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovérico en el medio de cultivo.
- 20 Otro sistema de entrega dirigido para polinucleótidos de ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, esferas y sistemas a base de lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta descripción es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y entregarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, y col., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los procedimientos para la transferencia eficaz de genes usando un vehículo liposómico se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino y col., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente, en combinación con esteroides, especialmente, colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

#### EJEMPLIFICACIÓN

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

#### **Ejemplo 1: Generación de proteínas de fusión de ActRIIB-Fc**

- 45 Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActRIIB soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIB humana fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo (tres aminoácidos de glicina) intermedio. Las construcciones se denominan ActRIIB(20-134)-hFc y ActRIIB(20-134)-mFc, respectivamente.
- 50 ActRIIB(20-134)-hFc se muestra a continuación como purificada a partir de estirpes celulares CHO (SEQ ID NO: 5)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIEL  
 VKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT  
 YEPPTAPTGGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPVIKTKISKAAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Las proteínas de ActRIIB(20-134)-hFc y ActRIIB(20-134)-mFc se expresaron en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

- (i) melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 7)
- 5 (ii) activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 8)
- (iii) natural: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 9).

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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLE  
RCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV  
YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKIEKTIKAKGQPREP  
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

Este polipéptido se codifica mediante la siguiente secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:10):

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

15

La secuenciación del extremo amínico del material producido a partir de células CHO reveló una secuencia principal de-GRGEAE (SEQ ID NO: 11). Notablemente, otras construcciones descritas en la bibliografía comienzan con una secuencia -SGR....

20 La purificación se podría conseguir mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en columna de Q Sepharose, cromatografía en columna de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración vírica e intercambio de tampón.

25

Las proteínas de fusión de ActRIIB-Fc también se expresaron en células HEK293 y células COS. Aunque el material de todas las estirpes celulares y las condiciones de cultivo razonables proporcionaron proteína con actividad de formación de músculo in vivo, se observó variabilidad en la potencia relacionada, quizás, con la selección de la estirpe celular y/o las condiciones de cultivo.

30

Ejemplo 2: Generación de mutantes de ActRIIB-Fc

Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre ActRIIB extracelular y un dominio Fc. La fusión de fondo de ActRIIB-

35

Fc tiene la secuencia (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 12).

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIEL  
 VKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT  
 YEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPVPPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Se introdujeron diversas mutaciones, que incluyen truncamientos amino- y carboxiterminales, en la proteína ActRIIB-Fc de base. En base a los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que estas construcciones, si se expresan con una secuencia líder de TPA, carezcan de la serina aminoterminal. Las mutaciones se generaron en el dominio extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Después de PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, se digirieron con Sfol y Agel y se purificaron con gel. Estos fragmentos se ligaron al vector de expresión pAID4 (véase el documento WO2006/012627) de tal manera que, tras la ligadura, se creó una quimera de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en DH5 alfa de E. coli, se recogieron las colonias y se aislaron los ADN. Para las construcciones murinas (mFc), se substituyó una IgG2a murina por la IgG1 humana. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección transitoria. En resumen, en una centrifugadora de 500 ml, las células HEK293T se ajustaron a  $6 \times 10^5$  células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250 ml y se hicieron crecer durante la noche. Al día siguiente, estas células se trataron con complejo de ADN:PEI (1:1) a concentración final de ADN de 0,5 ug/ml. Después de 4 horas, se añadieron 250 ml de medio y las células se hicieron crecer durante 7 días. El medio acondicionado se recogió centrifugando las células y se concentró.

Los mutantes se purificaron usando un abanico de técnicas, que incluyen, por ejemplo, una columna de proteína A, y se eluyeron con amortiguador de glicina de pH bajo (3,0). Después de la neutralización, estos se dializaron contra PBS.

También se produjeron mutantes en células CHO mediante metodología similar.

Los mutantes se probaron en ensayos de unión y/o bioensayos. En algunos aspectos, los ensayos se realizaron con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas. Las variantes se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente publicadas WO 06/012627 y WO 08/097541. Tales variantes pueden usarse en los procedimientos descritos en esta invención.

### **Ejemplo 3: Efecto de la variante truncada de ActRIIB (25-131)-hFc sobre la esteatosis hepática en un modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es un espectro de trastornos hepáticos cada vez más comunes que se considera ampliamente como la manifestación hepática del síndrome metabólico y se caracteriza por el depósito de grasa en el hígado (esteatosis), a menudo con efectos nocivos. Un subconjunto de pacientes con NAFLD desarrolla una afección inflamatoria conocida como esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que puede avanzar más a fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Perlemuter y col., 2007, Nat Clin Pract Endocrinol Metab 3: 458-469). Los solicitantes generaron una proteína de fusión truncada de ActRIIB (25-131)-hFc (**Figuras 1-2**), usando el mismo líder y metodología que se describieron anteriormente con respecto a ActRIIB (20-134)-hFc. La proteína madura purificada después de la expresión en células CHO tiene la secuencia que se muestra a continuación (SEQ ID NO: 6):

ETRECIYYNA NWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVK  
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPVTCV  
VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK

- Como se muestra a continuación, ActRIIB(25-131)-hFc podría inhibir la esteatosis hepática mientras produce cambios beneficiosos en parámetros estrechamente relacionados en un modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta. Se trataron ratones C57BL/6 de diez semanas con ActRIIB(25-131)-hFc, a 10 mg/kg, sc, o vehículo de solución salina tamponada con Tris (TBS) dos veces por semana durante 60 días. Durante este período, los ratones tuvieron acceso ilimitado a una dieta que contenía 58% de grasa en lugar del pienso estándar que contenía 4,5% de grasa. Un grupo adicional de ratones mantenidos con la dieta de pienso estándar también se trató con vehículo TBS y se siguió como un control alimentario.
- 10 La biopsia hepática se consideró el método de referencia para el diagnóstico de NAFLD, por lo que al finalizar el estudio se retiró el hígado y se analizó histológicamente. El tejido hepático de los ratones alimentados con una dieta rica en grasas exhibió una gran cantidad de gotículas de lípidos densamente empaquetadas, según la evaluación con tinción con Oil Red O, mientras que los ratones alimentados con la dieta estándar no mostraron depósitos de lípidos hepáticos (**Figura 3**). El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc revirtió casi por completo el depósito de lípidos hepáticos
- 15 y normalizó la apariencia del tejido hepático a pesar de la dieta rica en grasas. Por tanto, ActRIIB(25-131)-hFc fue un inhibidor eficaz de la esteatosis hepática provocada por una dieta rica en grasas.

El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc también indujo cambios beneficiosos en los criterios de valoración que guardan una fuerte correlación con la esteatosis hepática en la enfermedad del hígado graso del tipo alcohólico como del tipo no alcohólico. La adiponectina, una hormona derivada de la grasa, cuya concentración varía inversamente con la masa grasa/obesidad, ejerce importantes acciones sensibilizantes de la insulina en los tejidos diana (Yamauchi y col., 2001, Nat Med 7:941-946; Maeda y col., 2002, Nat Med 8:731-737; Kadowaki y col., 2005, Endocr Rev 26:439-451). Las concentraciones de adiponectina también son importantes en la enfermedad del hígado graso de tipo alcohólico (You y col., 2009, Exp Biol Med 234:850-859). El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc elevó los niveles de ARNm de adiponectina en la grasa blanca del epidídimo (**Figura 4**), así como las concentraciones circulantes de adiponectina (**Figura 5**). Es importante destacar que estos cambios se acompañaron en ratones tratados con ActRIIB (25-131)-hFc mediante fuertes disminuciones en las concentraciones circulantes de insulina (**Figura 6**), triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que condujo a la normalización de casi todos estos parámetros. Finalmente, los efectos mencionados anteriormente fueron acompañados por cambios beneficiosos en la composición corporal, según lo determinado por resonancia magnética nuclear (RMN) al inicio del estudio y el día 48. Bajo condiciones alimentarias altas en grasas, la masa de grasa total en los controles tratados con vehículo se triplicó durante este período de 48 días, y el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc redujo este aumento en casi un 40%. En resumen, el tratamiento con ActRIIB (25-131)-hFc en condiciones alimentarias altas en grasas 1) previno la esteatosis hepática, 2) aumentó las concentraciones de adiponectina circulante, 3) redujo las concentraciones de insulina circulante, coherente con una mayor sensibilidad a la insulina 4) produjo cambios beneficiosos en el perfil de lípidos séricos, y 5) mejoró la composición corporal.

#### **Ejemplo 4: Efecto de la variante truncada de ActRIIB (25-131)-mFc sobre la esteatosis hepática en un modelo de ratón de aterogénesis**

Los ratones genéticamente deficientes en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) son un modelo experimental de aterogénesis ampliamente utilizado. Cuando se les alimenta con una dieta rica en grasas y colesterol, los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> desarrollan hipercolesterolemia y lesiones ateromatosas (Breslow, 1996, Science 272:685-688). Por lo tanto, los solicitantes investigaron la capacidad de ActRIIB(25-131)-mFc para mejorar la esteatosis hepática en este modelo cuando se administra de forma terapéutica (después de una fase de pretratamiento alimentario). A partir de los cinco meses de edad, se les dio a los ratones macho *ldlr*<sup>-/-</sup> (fondo C57BL/6) acceso continuo a una dieta de pienso estándar (Harlan Teklad Diet 2018, que contenía un 5,8% de grasa) o una dieta rica en grasas y colesterol (Harlan Teklad Diet 94059, dieta «Paigan» libre de colato que contenía aproximadamente un 15,8% de grasa y un 1,25% de colesterol). A partir de ocho semanas después del inicio de estas respectivas dietas, los ratones fueron tratados dos veces por semana, por vía subcutánea, con ActRIIB (25-131)-mFc (10 mg/kg) o vehículo (solución salina tamponada con Tris) durante 16 semanas, acompañado de la administración continuada del régimen alimentario. Los ratones silvestres tratados con vehículo mantenidos con la dieta estándar sirvieron como control adicional.

Hubo una clara evidencia de esteatosis hepática en el modelo aterogénico. En comparación con los ratones silvestres alimentados con la dieta estándar, los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> alimentados con la dieta rica en grasas durante 24 semanas mostraron una marcada reducción en la densidad del tejido hepático, según lo determinado por tomografía microcomputarizada (micro-CT) (**Figura 7**). La reducción de la densidad hepática general a valores que tienden por debajo de la densidad del agua (definida en este análisis como cero) estuvo acompañada de agrandamiento del hígado y es indicativa de esteatosis hepática. En comparación con los ratones aterogénicos tratados con vehículo, los tratados con ActRIIB (25-131)-mFc mostraron una densidad hepática significativamente aumentada (mejorada) (**Figura 7**), a pesar de que dichos ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas durante 8 semanas antes de recibir ActRIIB(25-131)-mFc. Además, los ratones aterogénicos tratados con ActRIIB (25-131)-mFc también mostraron una

normalización de la composición corporal, las concentraciones de hemoglobina glucosilada (A1C), los pesos de los depósitos de grasa y los niveles de triglicéridos en suero a los valores observados en controles silvestres (datos no mostrados).

- 5 Tomados en conjunto, estos datos indican que las proteínas de fusión de ActRIIB-Fc solubles pueden usarse como antagonistas de la señalización por ligandos de la familia TGF- $\beta$  para aumentar las concentraciones de adiponectina circulante y mejorar la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana, tratando así la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad del hígado graso alcohólico, y potencialmente también otras afecciones.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> ACCELERON PHARMA INC.

5 <120> PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO

<130> P38770EP-PCT

<140> EP10829042.0

10 <141> 03/11/2010

<150> US 61/280.544

<151> 2009-11-03

15 <160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Thr  
115

<210> 2

<211> 512

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

35

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



ES 2 869 864 T3

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser  
 260 265 270  
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys  
 275 280 285  
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp  
 290 295 300  
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg  
 305 310 315 320  
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val  
 325 330 335  
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro  
 340 345 350  
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu  
 355 360 365  
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile  
 370 375 380  
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu  
 405 410 415  
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val  
 420 425 430  
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp  
 450 455 460  
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu  
 465 470 475 480  
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu  
 485 490 495  
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
 500 505 510

<210> 3  
 <211> 348  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 869 864 T3

tctgggctg	gggaggctga	gacacgggag	tgcatctact	acaacgcaa	ctgggagctg	60
gagcgcacca	accagagcgg	cctggagcgc	tgcaaggcgg	agcaggacaa	gcggctgcac	120
tgctacgcct	cctggcgcaa	cagctctggc	accatcgagc	tcgtgaagaa	gggtgctgg	180
ctagatgact	tcaactgcta	cgataggcag	gagtgtgtgg	ccactgagga	gaacccccag	240
gtgtacttct	gctgctgtga	aggcaacttc	tgcaacgagc	gcttactca	tttgccagag	300
gctgggggcc	cggaagtac	gtacgagcca	ccccgcagc	ccccacc		348

<210> 4

5 <211> 1539

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

10

atgacggcgc	cctgggtggc	cctcgccctc	ctctggggat	cgctgtggcc	cggtctggg	60
cgtagggagg	ctgagacacg	ggagtgcac	tactacaacg	ccaactggga	gctggagcgc	120
accaaccaga	gcggcctgga	gctgctgcaa	ggcagcagc	acaagcggct	gcactgctac	180
gcctcctggc	gcaacagctc	tggcaccatc	gagctcgtga	agaagggtg	ctggctagat	240
gacttcaact	gctacgatag	gcaggagtgt	gtggccactg	aggagaacct	ccaggtgtac	300
ttctgctgct	gtgaaggcaa	cttctgcaac	gagcgcttca	ctcatttgcc	agaggtggg	360
ggcccgggaag	tcacgtacga	gccacccccg	acagccccca	ccctgctcac	ggtgctggcc	420
tactcactgc	tgcccatcgg	gggcctttcc	ctcatcgtcc	tgctggcctt	ttgatgtac	480
cgcatcgc	agcccccta	cggtcatgtg	gacatccatg	aggaccctgg	gcctccacca	540
ccatcccctc	tgggtggcct	gaagccactg	cagctgctgg	agatcaaggc	tcgggggcgc	600
tttggtgtg	tctggaaggc	ccagctcatg	aatgactttg	tagctgtcaa	gatcttcca	660
ctccaggaca	agcagtcgtg	gcagagtga	cgggagatct	tcagcacacc	tggcatgaag	720
cacgagaacc	tgctacagtt	cattgctgcc	gagaagcagc	gctccaacct	cgaagtagag	780
ctgtggctca	tcacggcctt	ccatgacaag	ggctccctca	cggattacct	caaggggaac	840
atcatcacat	ggaacgaact	gtgtcatgta	gcagagacga	tgtcacgagg	cctctcatac	900
ctgcatgagg	atgtgccctg	gtgccgtggc	gagggccaca	agccgtctat	tgcccacagg	960
gactttaaaa	gtaagaatgt	attgctgaag	agcagacctca	cagccgtgct	ggctgacttt	1020
ggcttggctg	ttcgatttga	gccagggaaa	cctccagggg	acaccacgg	acaggtaggc	1080
acgagacggg	acatggctcc	tgaggtgctc	gagggagcca	tcaacttcca	gagagatgcc	1140

ES 2 869 864 T3

```

ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc      1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag      1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt      1320
aaagatcact ggttgaaca cccgggctg gccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc      1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgccc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg      1440
attcggaggt cggccaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc      1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa      1539

```

<210> 5

<211> 343

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 869 864 T3

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 195 200 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 210 215 220

Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 340

<210> 6  
 <211> 335  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

10  
 <400> 6

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg  
 1 5 10 15

ES 2 869 864 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 130 135 140

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 210 215 220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 245 250 255

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 260 265 270

ES 2 869 864 T3

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 7

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Apis sp.

<400> 7

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

Ser Tyr Ile Tyr Ala  
 20

10

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Desconocido

<220>

<223> Activador tisular del plasminógeno

20 <400> 8

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

Ala Val Phe Val Ser Pro  
 20

<210> 9

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Desconocido

< 220>

30

< 223> Secuencia líder nativa

<400> 9

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

Ser Ser Gly Ala  
 20

35

ES 2 869 864 T3

<210> 10  
 <211> 1107  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 10

10

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcatcta ctacaacgcc      120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggccctggagc gctgcaagg cgagcaggac      180
aagcggctgc actgctacgc ctccctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag      240
aagggtgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag      300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcaact      360
catttgccag aggtggggg cccggaagt cagtagcagc ccccccgac agccccacc      420
ggtggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      480
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc      540
acatgctggt tgggtggact gagccaagaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgagg aggagcagta caacagcacg      660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      720
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaagcc      780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc      840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      960
tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag     1080
agcctctccc tgtctccggg taaatga                                     1107
  
```

<210> 11  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Péptido sintético

20

<400> 11

Gly Arg Gly Glu Ala Glu  
 1 5

25 <210> 12  
 <211> 344  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 869 864 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 180 185 190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 195 200 205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 210 215 220

ES 2 869 864 T3

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
245 250 255

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
260 265 270

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
275 280 285

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
290 295 300

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
340

<210> 13

<211> 225

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<220>

<221> variante

<222> (43)..(43)

15 <223> puede ser Ala

<220>

<221> variante

20 <222> (100)..(100)

<223> puede ser Ala

<220>

<221> variante

25

<222> (212)..(212)

<223> puede ser Ala

<400> 13

30

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
1 5 10 15

ES 2 869 864 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys  
 225

<210> 14

<211> 360

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 14

ES 2 869 864 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
145 150 155 160

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

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro



ES 2 869 864 T3

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

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

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

ggtaggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456  
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 516  
acatgctggtg tggtaggtg gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 576  
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 636  
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 696  
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc 756  
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 816  
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 876  
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936  
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996  
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1056  
agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083

<210> 16

<211> 108

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 16

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu  
1 5 10 15

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

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

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

Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys



ES 2 869 864 T3

<211> 4  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 21

Gly Gly Gly Gly  
 1

10  
 <210> 22  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Marcador 6xHis sintético

20 <400> 22

--- --  
 His His His His His His  
 1 5

<210> 23  
 25 <211> 368  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 23

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

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

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

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

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

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

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

35

ES 2 869 864 T3

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro  
 115 120 125  
 Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 165 170 175  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 180 185 190  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 195 200 205  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 210 215 220  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 225 230 235 240  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 260 265 270  
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 275 280 285  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 290 295 300  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 325 330 335  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 340 345 350  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355 360 365

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para usar en el tratamiento de la enfermedad del ácido graso en un paciente que lo necesita, donde la composición comprende un anticuerpo anti-ActRIIB.
- 5 2. Uso de una composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso en un paciente que lo necesita, donde la composición comprende un anticuerpo anti-ActRIIB.
3. La composición para uso según la reivindicación 1 o el uso según la reivindicación 2, donde el anticuerpo  
10 es un anticuerpo monoclonal.
4. La composición para uso según la reivindicación 1 o 3 o el uso según la reivindicación 2 o 3, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 15 5. La composición para uso según la reivindicación 1 o 3 o el uso según la reivindicación 2 o 3, donde el anticuerpo es humanizado.
6. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5 o el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde el paciente tiene resistencia a la insulina.
- 20 7. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6 o el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde el paciente tiene resistencia a la insulina y un trastorno metabólico.
8. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-7 o el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, donde el anticuerpo inhibe la esteatosis hepática en el paciente tratado.
- 25 9. La composición para uso según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 8, donde la enfermedad del hígado graso es enfermedad del hígado graso no alcohólico.

ES 2 869 864 T3

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

FIGURA 1

ES 2 869 864 T3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

A E T R E C I Y Y

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA  
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C

101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC  
TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S

151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCACAACG  
CTTCCGCTCG TCCTGTTCCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

S G F I E L V K K G C W L D D F

201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA  
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAAGT

N C Y D R Q E C V A F E E N P Q V

251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG  
TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

Y F C C C E G N F C N E R F T H L

301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT  
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

P E A G G P E V T Y E P P P F

351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG  
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA  
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTTCAG  
TTCTGTTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
CGTTCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

FIGURA 2

ES 2 869 864 T3

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
CTCTTGTTGA TGTTCCTGGT GCGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

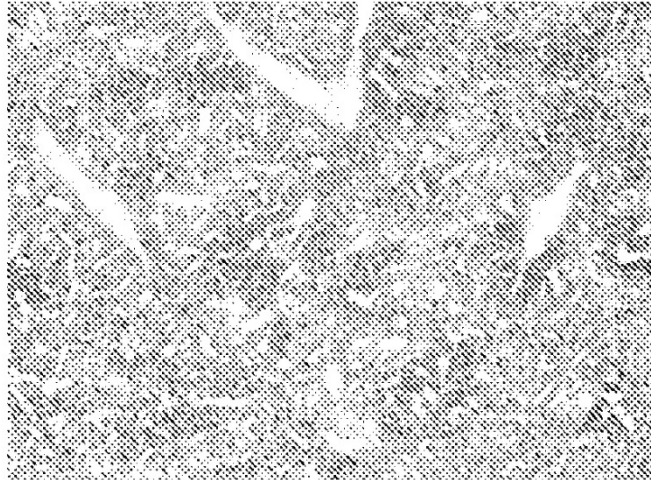
951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

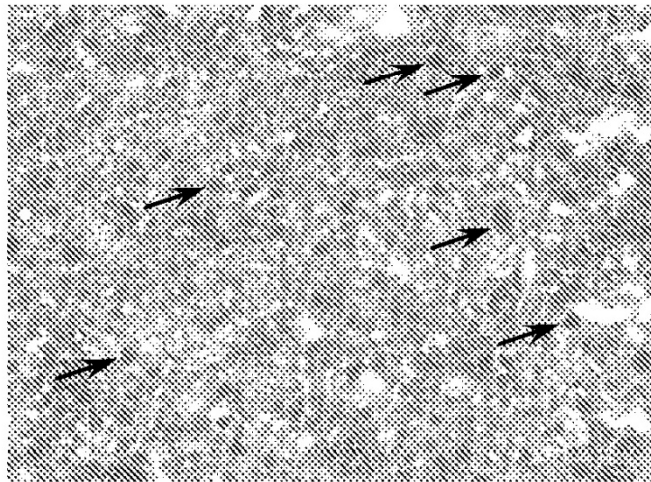
1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA  
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT

FIGURA 2 (Continuación)

Dieta estándar +  
vehículo



Dieta alta en  
grasas + vehículo



Dieta alta  
en grasas +  
ActRIIB(25-131)-hFc

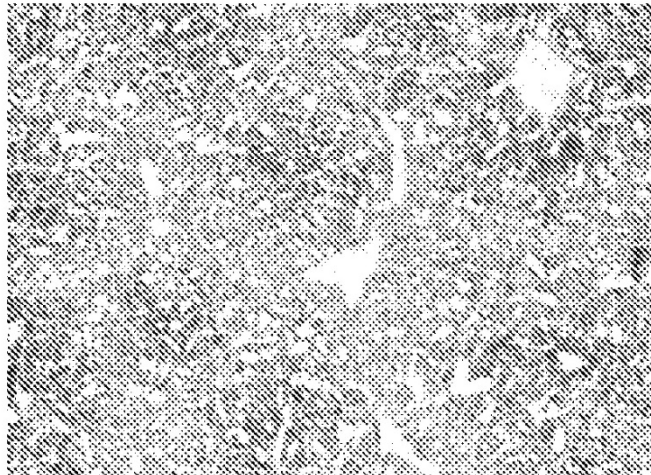


FIGURA 3

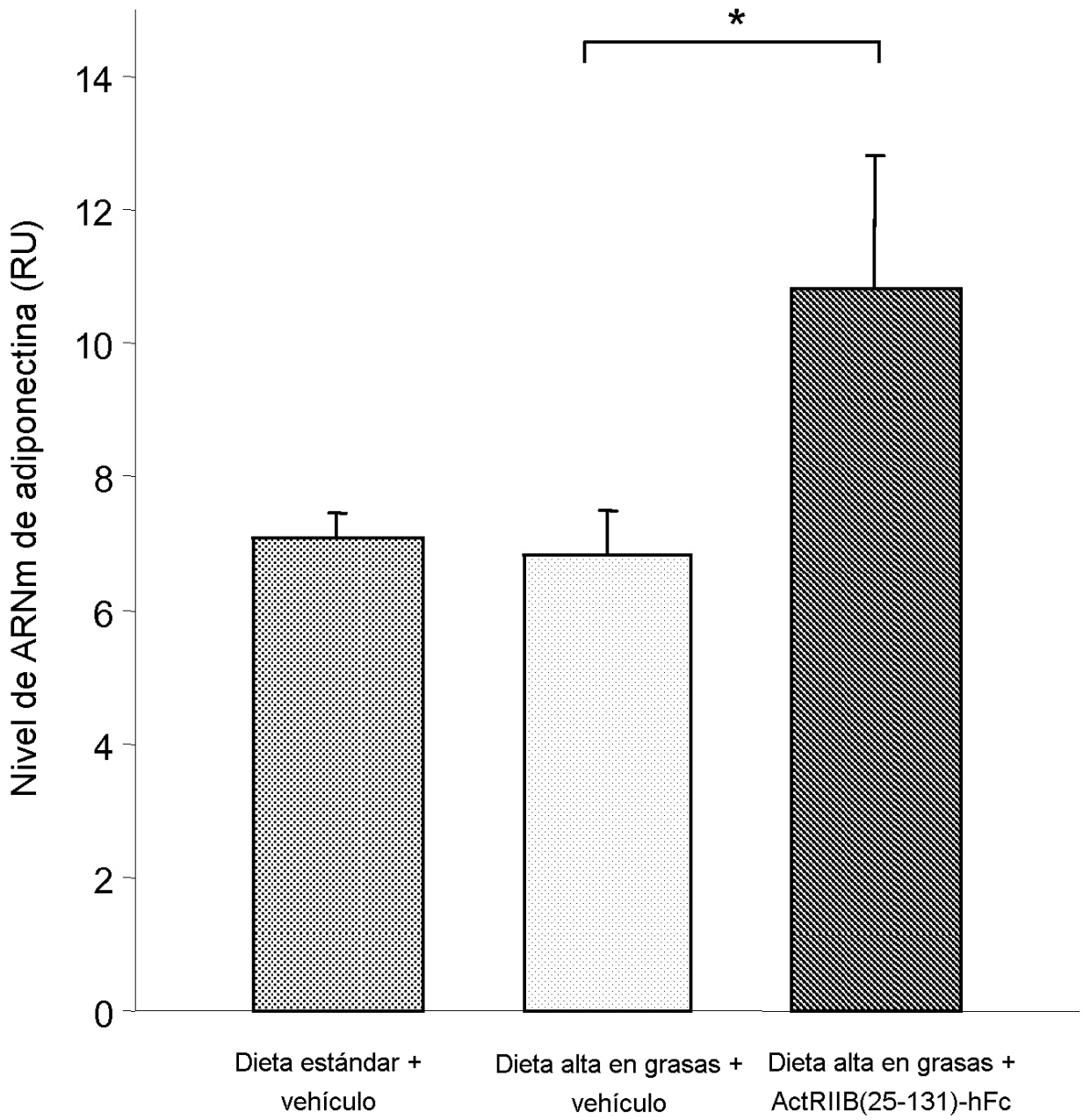


FIGURA 4

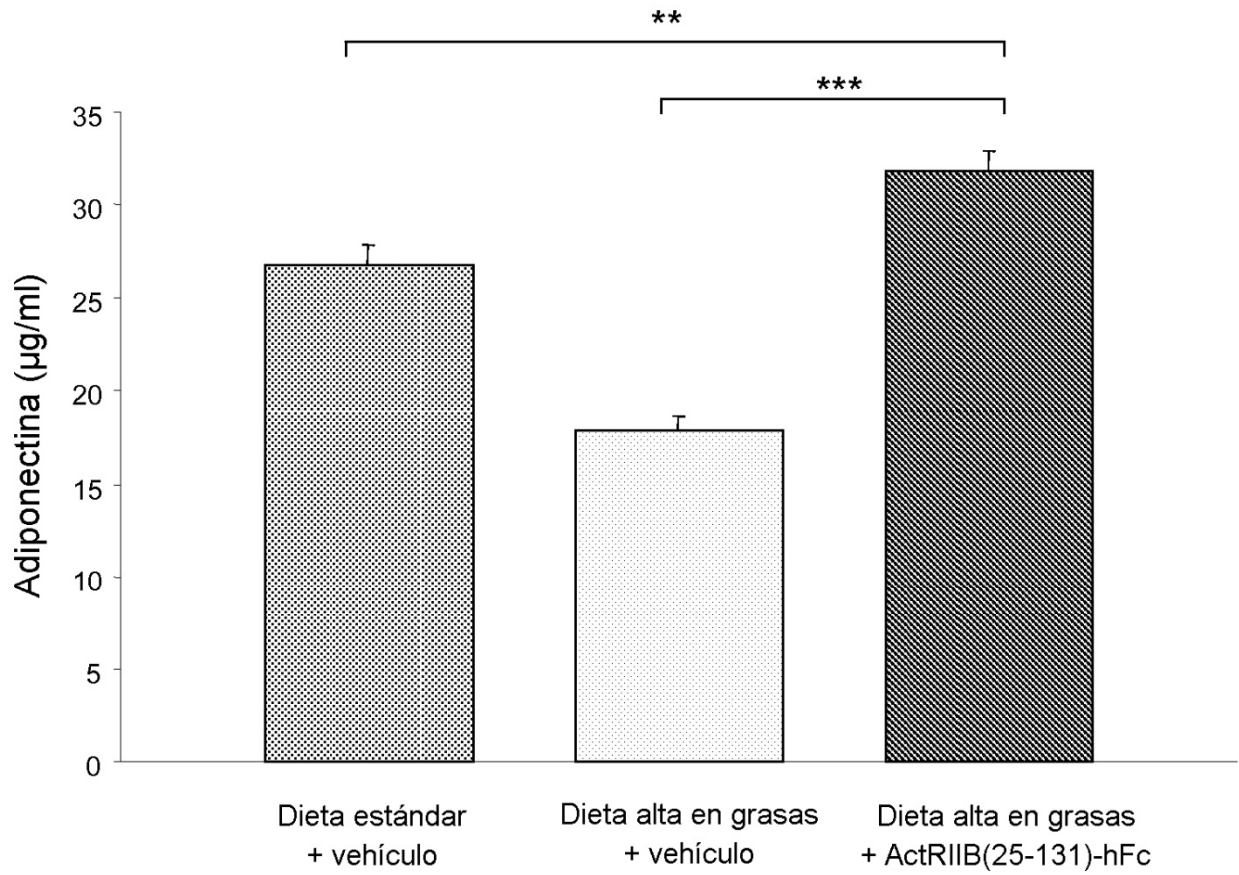


FIGURA 5

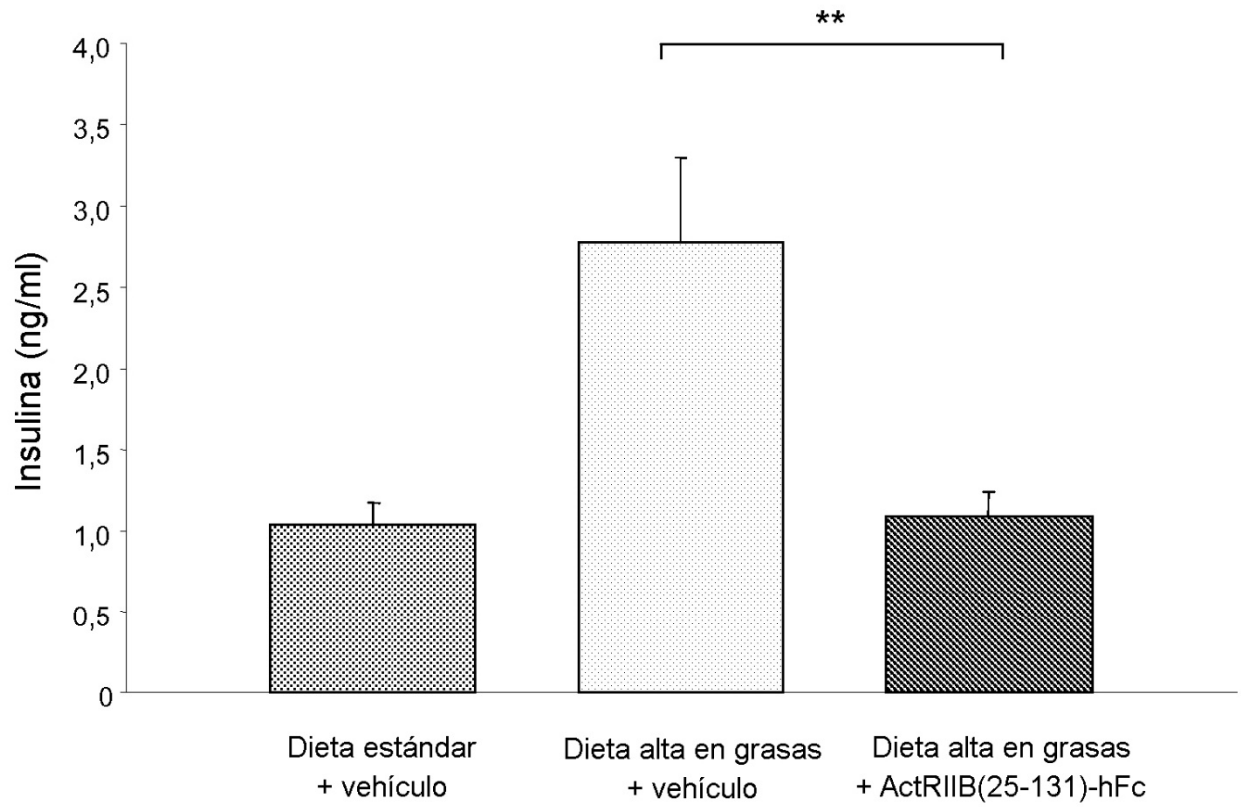


FIGURA 6

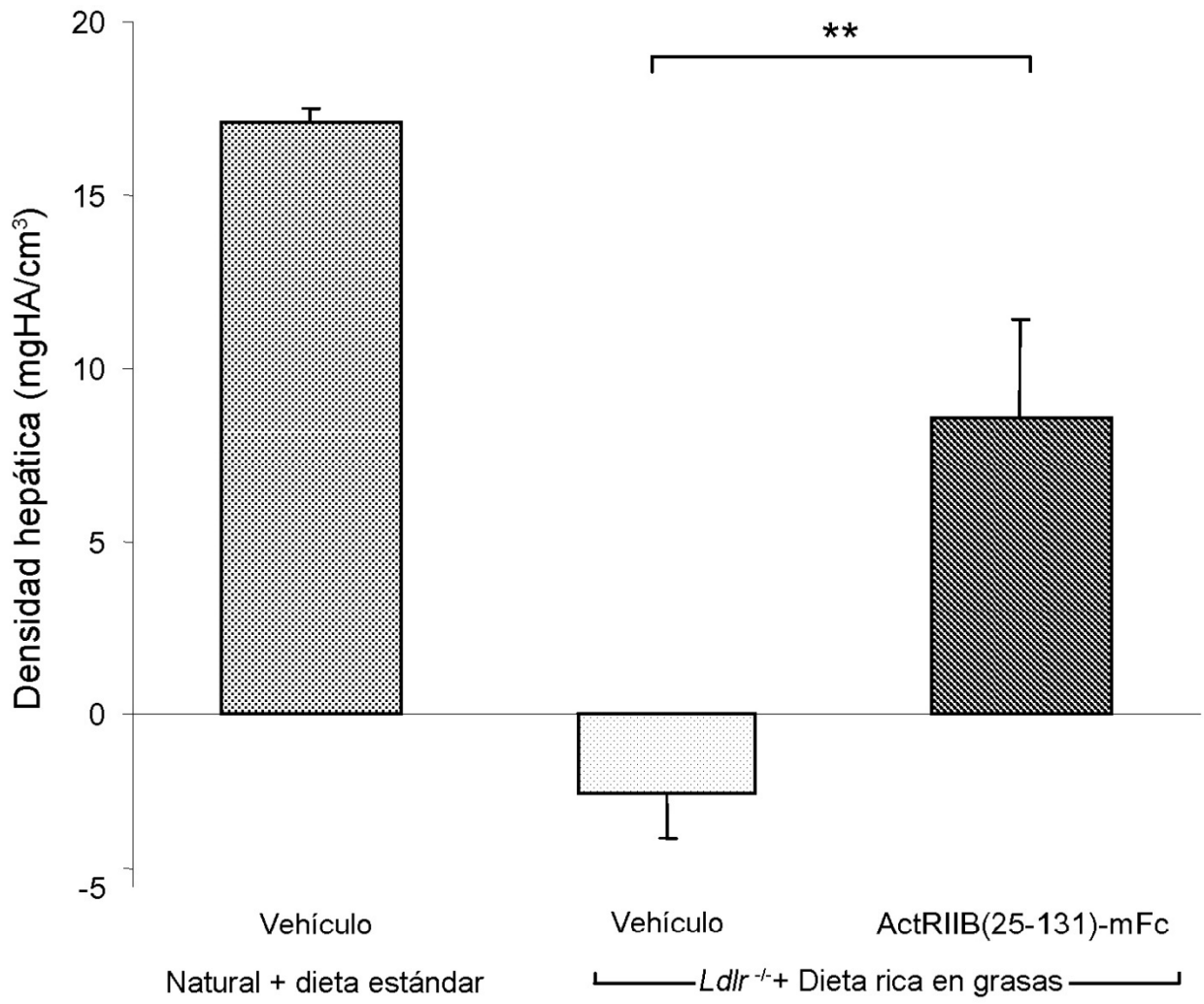


FIGURA 7