

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 978 963**

(51) Int. Cl.:

A61P 9/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054674**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16069234**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15855379 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 3204118**

(54) Título: **Tratamiento de enfermedad cardiovascular usando ligandos trampa de ActRII**

(30) Prioridad:

09.10.2014 US 201462062021 P
11.11.2014 US 201462078321 P
14.01.2015 US 201562103515 P
27.05.2015 US 201562167052 P
02.06.2015 US 201562170015 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

(73) Titular/es:

CELGENE CORPORATION (50.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US y
WASHINGTON UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

HRUSKA, KEITH;
FANG, YIFU;
SMITH, WILLIAM y
CHEN, NIANHANG

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 978 963 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

Tratamiento de enfermedad cardiovascular usando ligandos trampa de ActRII

5 4. CAMPO

En el presente documento se proporciona un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (inhibidor de la señalización de ActRII, por ejemplo, un ligando trampa de activina) para su uso en métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedad cardiovascular, calcificación vascular, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular, y/o enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal en un sujeto, y el sujeto ha sido seleccionado para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, calcificación vascular, niveles elevados de rigidez arterial, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda, y/o enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal, usando el nivel y/o actividad de uno o más biomarcadores, en particular, homólogo 1 de snail (Snail), fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, colágeno de tipo 1 alfa 1 (col1a1), factor de transcripción relacionado con runt 2 (Runx2), Osterix, telopeptido de colágeno de tipo 1 carboxiterminal (CTX), acción del músculo liso alfa (alfa-SMA), miocardina (MYOCD), proteína de inhibición del eje 2 (Axin2) y/o proteína 22-alfa de músculo liso (Sm22-alfa), como indicador(es) de la capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento, a la eficacia del tratamiento, o a la dosis adecuada para el tratamiento con un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII).

5. ANTECEDENTES

Una complicación frecuente de la enfermedad renal que implica anemia es la calcificación vascular, que conduce, en muchos casos, a enfermedad cardiovascular. En los sujetos renales, la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular resultante pueden provocar una mortalidad significativa, aparte de la mortalidad asociada a la enfermedad renal de por sí. Por ello, existe una necesidad continua de descubrir y desarrollar nuevos fármacos y métodos de tratamiento y/o prevención de las enfermedades cardiovasculares en sujetos renales. Además, dado que los sujetos renales padecen frecuentemente anemia, sería beneficioso tratar la anemia y la enfermedad cardiovascular concomitante con un único terapéutico, una capacidad que no poseen los agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE) usados actualmente, tales como la eritropoyetina.

Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como los receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF-beta, que incluyen BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 es el receptor de tipo I principal para activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 puede servir de receptor para activinas también, particularmente para la activina B.

Un ligando trampa de activina, que consiste en una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular del receptor de activina de tipo IIA (ActRIIA) y el Fc IgG1 humano (denominada en el presente documento ActRIIA-hFc o "sotatercept"; SEQ ID NO: 7), se está evaluando actualmente en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de sujetos con anemia y trastornos óseos asociados a la enfermedad renal terminal (ERT), así como para aquellos sujetos con betatalasemia. En mujeres posmenopáusicas sanas, se mostró que ActRIIA-hFc aumentaba significativamente el hematocrito (Hct) y la hemoglobina (Hgb), así como la densidad mineral ósea. El documento de patente WO 2006/012627 describe una composición y métodos de modulación del crecimiento de un tejido, y métodos de cribado de compuestos que modulan la actividad de una proteína ActRII y/o un ligando de ActRII. El documento de patente WO 2014/071158 describe antagonistas de activina-ActRII y usos para tratar.

50 6. SUMARIO

La invención proporciona un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una dosis farmacéuticamente eficaz de dicho inhibidor de la señalización de ActRII,

en donde el sujeto ha sido seleccionado basándose en:

- (a) niveles elevados del factor 2 de transcripción relacionado con runt (Runx2) en comparación con los niveles de Runx2 en una población de referencia;
- (b) niveles elevados del homólogo 1 de Snail (Snail) en comparación con los niveles de Snail en una población de referencia;
- (c) niveles elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles de fosfoSmad2 en una población de referencia;

(d) niveles elevados de colágeno de tipo 1 alfa 1 (collal) en comparación con los niveles de collal en una población de referencia;

5 (e) niveles elevados de telopéptido de colágeno de tipo 1 carboxiterminal (CTX) en comparación con los niveles de CTX en una población de referencia;

(f) niveles elevados de Osterix en comparación con los niveles de Osterix en una población de referencia;

10 (g) niveles reducidos de actina alfa de músculo liso (alfa-SMA) en comparación con los niveles de alfa-SMA en una población de referencia;

(h) niveles reducidos de miocardina (MYOCD) en comparación con los niveles de MYOCD en una población de referencia;

15 (i) niveles reducidos de proteína inhibidora del eje 2 (Axin2) en comparación con los niveles de Axin2 en una población de referencia;

(j) niveles reducidos de proteína 22-alfa de músculo liso (Sm22-alfa) en comparación con los niveles de Sm22-alfa en una población de referencia;

20 (k) niveles elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles de fosfoSmad3 en una población de referencia; y/o

25 (l) niveles elevados de proteínas urinarias en comparación con los niveles de proteína urinaria en una población de referencia,

en donde la población de referencia:

30 (i) consiste en personas sanas;

(ii) consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que el sujeto;

(iii) consiste en personas sin enfermedad cardiovascular;

35 (iv) consiste en personas sin calcificación vascular;

(v) consiste en personas sin enfermedad renal;

(vi) consiste en personas sin enfermedad renal crónica;

40 (vii) consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial; o

(viii) consiste en personas sin hipertrofia ventricular izquierda, y

45 en donde la enfermedad es:

(a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica en estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica con enfermedad mineral y ósea;

50 (b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;

(c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;

55 (d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o

(e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.

60 La invención proporciona además un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende:

(a) administrar al sujeto una dosis inicial de un inhibidor de la señalización de ActRII;

65 (b) tomar una primera medición del nivel de Snai 1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto;

(c) después de un periodo de tiempo, tomar una segunda medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto; y

5 (d) administrar al sujeto una dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII, y en donde la dosis ajustada se basa en el cambio detectado entre la primera medición y la segunda medición, tratando y/o previniendo así dicha enfermedad,

y en donde dicha enfermedad es:

10 (a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica de estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica mineral y ósea; o

(b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;

15 (c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;

(d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o

20 (e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.

25 En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización ActRII es de aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, o aproximadamente 1 g, o de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,3 mg/kg.

30 En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,7 mg/kg.

35 En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra mediante inyección. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra mediante (i) una vez cada 28 días; o (ii) una vez cada 42 días. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra una vez cada 21 días. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra de forma continua y/o indefinida.

40 En ciertas realizaciones, los niveles elevados de Snai1, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, respectivamente, en la población de referencia.

45 En ciertas realizaciones, los niveles elevados de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, respectivamente, en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior de la población de referencia.

50 En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la población de referencia.

55 En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior de la población de referencia.

60 La invención proporciona un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una dosis farmacéuticamente eficaz de dicho inhibidor de la señalización de ActRII,

en donde el sujeto ha sido seleccionado basándose en:

(a) niveles elevados del factor 2 de transcripción relacionado con runt (Runx2) en comparación con los niveles de Runx2 en una población de referencia;

5 (b) niveles elevados del homólogo 1 de Snail (Snail) en comparación con los niveles de Snail en una población de referencia;

(c) niveles elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles de fosfoSmad2 en una población de referencia;

10 (d) niveles elevados de colágeno de tipo 1 alfa 1 (collal) en comparación con los niveles de collal en una población de referencia;

(e) niveles elevados de telopeptido de colágeno de tipo 1 carboxiterminal (CTX) en comparación con los niveles de CTX en una población de referencia;

15 (f) niveles elevados de Osterix en comparación con los niveles de Osterix en una población de referencia;

(g) niveles reducidos de actina alfa de músculo liso (alfa-SMA) en comparación con los niveles de alfa-SMA en una población de referencia;

20 (h) niveles reducidos de miocardina (MYOCD) en comparación con los niveles de MYOCD en una población de referencia;

(i) niveles reducidos de proteína inhibidora del eje 2 (Axin2) en comparación con los niveles de Axin2 en una población de referencia;

25 (j) niveles reducidos de proteína 22-alfa de músculo liso (Sm22-alfa) en comparación con los niveles de Sm22-alfa en una población de referencia;

(k) niveles elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles de fosfoSmad3 en una población de referencia; y/o

(l) niveles elevados de proteínas urinarias en comparación con los niveles de proteína urinaria en una población de referencia,

35 en donde la población de referencia:

(i) consiste en personas sanas;

(ii) consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que el sujeto;

40 (iii) consiste en personas sin enfermedad cardiovascular;

(iv) consiste en personas sin calcificación vascular;

45 (v) consiste en personas sin enfermedad renal;

(vi) consiste en personas sin enfermedad renal crónica;

(vii) consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial; o

50 (viii) consiste en personas sin hipertrofia ventricular izquierda, y

en donde la enfermedad es:

55 (a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica en estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica con enfermedad mineral y ósea;

(b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;

60 (c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;

(d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o

65 (e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.

La invención proporciona además un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende:

- (a) administrar al sujeto una dosis inicial de un inhibidor de la señalización de ActRII;
- 5 (b) tomar una primera medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto;
- 10 (c) después de un periodo de tiempo, tomar una segunda medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto; y
- (d) administrar al sujeto una dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII, y en donde la dosis ajustada se basa en el cambio detectado entre la primera medición y la segunda medición, tratando y/o previniendo así dicha enfermedad,

15 y en donde dicha enfermedad es:

- (a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica de estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica mineral y ósea; o
- 20 (b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;
- (c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;
- 25 (d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o
- (e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.

30 En ciertas realizaciones, la dosis inicial del inhibidor de la señalización de ActRII es de aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, o aproximadamente 1 g, o de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,3 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial del inhibidor de la señalización de ActRII es aproximadamente 0,7 mg/kg.

40 En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra por inyección. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra (i) una vez cada 28 días; o (ii) una vez cada 42 días. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 21 días.

45 En ciertas realizaciones, la dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII es mayor que la dosis inicial si: (a) el nivel de Runx2 es elevado en comparación con el nivel de Runx2 en una población de referencia; (c) el nivel de Snail es elevado en comparación con el nivel de Snail en una población de referencia; (d) el nivel de fosfoSmad2 es elevado en comparación con el nivel de fosfoSmad2 en una población de referencia; (f) el nivel de col1al es elevado en comparación con el nivel de col1a1 en una población de referencia; (i) el nivel de CTX es elevado en comparación con el nivel de CTX en una población de referencia; (j) el nivel de Osterix es elevado en comparación con el nivel de Osterix en una población de referencia; (l) el nivel de alfa-SMA es reducido con respecto al nivel de alfa-SMA en una población de referencia; (m) el nivel de MYOCD es reducido con respecto al nivel de MYOCD en una población de referencia; (n) el nivel de Sm22-alfa está reducido con respecto al nivel de Sm22-alfa en una población de referencia; (o) el nivel de fosfoSmad3 es elevado en comparación con el nivel de fosfoSmad3 en una población de referencia; (p) el nivel de proteína urinaria es elevado en comparación con el nivel de proteína urinaria en una población de referencia; y/o (r) el nivel de Axin2 es reducido en comparación con el nivel de Axin2 en una población de referencia.

55 En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 35 mg superior a la dosis inicial, o aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg superior a la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra más frecuentemente que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra cada 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35 o 40 días.

65 En ciertas realizaciones, la dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII es menor que la dosis inicial si: (a) el nivel de Runx2 disminuye en comparación con el nivel de Runx2 en una población de referencia; (d) el nivel de Snail

disminuye en comparación con el nivel de Snail en una población de referencia; (e) el nivel de fosfoSmad2 disminuye en comparación con el nivel de fosfoSmad2 en una población de referencia; (g) el nivel de col1a1 disminuye en comparación con el nivel de col1a1 en una población de referencia; (i) el nivel de CTX disminuye en comparación con el nivel de CTX en una población de referencia; (j) el nivel de Osterix disminuye en comparación con el nivel de Osterix en una población de referencia; (l) el nivel de alfa-SMA es elevado en comparación con el nivel de alfa-SMA en una población de referencia; (m) el nivel de MYOCD es elevado en comparación con el nivel de MYOCD en una población de referencia; (n) el nivel de Sm22-alfa es elevado en comparación con el nivel de Sm22-alfa en una población de referencia; (o) el nivel de fosfoSmad3 es reducido en comparación con el nivel de fosfoSmad3 en una población de referencia; (p) el nivel de proteína urinaria es reducido en comparación con el nivel de proteína urinaria en una población de referencia; y/o (r) el nivel de Axin2 es elevado en comparación con el nivel de Axin2 en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 35 mg menos que la dosis inicial, o aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg menos que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra menos frecuentemente que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra cada 30, 35, 40, 42, 50, 60, 70, 80 o 90 días. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra de forma continua y/o indefinida.

En ciertas realizaciones, la primera medición se toma antes del inicio del tratamiento. En ciertas realizaciones, la primera medición se toma inmediatamente después del inicio del tratamiento o en un plazo máximo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o 2 meses del mismo. En ciertas realizaciones, la segunda medición se toma inmediatamente después del inicio del tratamiento o en un plazo máximo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses del mismo.

En ciertas realizaciones, (a) los niveles elevados de Snai 1, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria, y/u Osterix son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, respectivamente, en la población de referencia; y/o (b) los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, (a) los niveles elevados de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria, y/u Osterix son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, respectivamente, en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior en la población de referencia; y/o (b) los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior en la población de referencia.

En ciertas realizaciones, (a) los niveles elevados de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la población de referencia; y/o (b) los niveles reducidos de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, o 100% menores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, respectivamente, en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, (a) los niveles elevados de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior de la población de referencia; y/o (b) los niveles reducidos de Snail, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, respectivamente, en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior de la población de referencia.

En ciertas realizaciones, el nivel de Snail, fosfomad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, fosfomad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel de proteína de Snail, fosfomad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfomad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, el nivel de proteína se determina mediante un enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). En ciertas realizaciones, el ELISA se lleva a cabo con (a) anticuerpo específico de Runx2 SC-390715 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Runx2; (c) anticuerpo específico de Snail sc-393172 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Snail; (d) anticuerpo específico de fosfomad2 sc-101801 (Santa Cruz) para determinar los niveles de fosfomad2; (f) anticuerpo específico de col1a1 sc-8784 (Santa Cruz) para determinar los niveles de collal; (i) anticuerpo específico de CTX ABIN1173415

(Antibodies Online) para determinar los niveles de CTX; (j) anticuerpo específico de Osterix SC-22538 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Osterix; (l) anticuerpo específico de alfa-SMA SC-53142 (Santa Cruz) para determinar los niveles de alfa-SMA; (m) anticuerpo específico de MYOCD SC-21561 (Santa Cruz) para determinar los niveles de MYOCD; (n) anticuerpo específico de Sm22-alfa SC-271719 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Sm22-alfa; y/o (o) anticuerpo específico de fosfoSmad3 sc-11769 (Santa Cruz) para determinar los niveles de fosfoSmad3.

5 En ciertas realizaciones, el nivel de Snail, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel de ARNm de Snail, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, el nivel de ARNm se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR). En ciertas realizaciones, la qRT-PCR se lleva a cabo con (a) cebadores específicos de Runx2 (SEQ ID NO: 48 y 49) para determinar los niveles de Runx2; (c) cebadores específicos de Snail (SEQ ID NO: 78 y 79) para determinar los niveles de Snail; (e) cebadores específicos de collal (SEQ ID NO: 82 y 83) para determinar los niveles de collal; (g) cebadores específicos de Osterix (SEQ ID NO: 52 y 53) para determinar los niveles de Osterix; y/o (i) cebadores específicos de Sm22-alfa (SEQ ID NO: 56 y 57) para determinar los niveles de Sm22-alfa.

10 En ciertas realizaciones, los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad3, proteína urinaria, fosfoSmad2, Axin2 y collal están en el riñón.

15 20 En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, Axin2 y/o alfa-SMA están en la aorta.

25 En ciertas realizaciones, la calcificación vascular es aterosclerosis calcificada, vasculopatía medial calcificada (también conocida como esclerosis medial calcificada de Mönckeberg), calcificación medial, elastocalcinosis, arteriolopatía urémica calcificante, estenosis valvular aórtica calcificada o calcificación de la vena porta.

30 35 En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es una enfermedad asociada a la calcificación vascular.

En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es secundaria a una enfermedad renal crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica en estadio 3, 4 o 5. En ciertas realizaciones, la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica con enfermedad mineral y ósea.

40 45 En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:2; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:2; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:2; (d) SEQ ID NO:2; (e) 90% idéntica a SEQ ID NO:3; (f) 95% idéntica a SEQ ID NO:3; (g) 98% idéntica a SEQ ID NO:3; (h) SEQ ID NO:3; (m) 90% idéntica a SEQ ID NO:7; (n) 95% idéntica a SEQ ID NO:7; (o) 98% idéntica a SEQ ID NO:7; (p) SEQ ID NO:7; (q) 90% idéntica a SEQ ID NO:12; (r) 95% idéntica a SEQ ID NO:12; (s) 98% idéntica a SEQ ID NO:12; (t) SEQ ID NO:12; (u) 90% idéntica a SEQ ID NO:17; (v) 95% idéntica a SEQ ID NO:17; (w) 98% idéntica a SEQ ID NO:17; (x) SEQ ID NO:17; (y) 90% idéntica a SEQ ID NO:20; (z) 95% idéntica a SEQ ID NO:20; (aa) 98% idéntica a SEQ ID NO:20; (bb) SEQ ID NO:20; (cc) 90% idéntica a SEQ ID NO:21; (dd) 95% idéntica a SEQ ID NO:21; (ee) 98% idéntica a SEQ ID NO:21; y (ff) SEQ ID NO:21. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIA y el dominio Fc de IgG1 humana.

50 55 En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es sotatercept (SEQ ID NO: 7; véase, por ejemplo, la Sección 9). Sotatercept es un ligando trampa de activina que es útil en los métodos descritos en el presente documento (véase la Sección 8).

En ciertas realizaciones, el sujeto es humano.

7. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 La **Fig. 1A** muestra el aumento de los niveles de activina-A (pg/ml) en el modelo de fibrosis intersticial de la enfermedad renal (ERC-3) en comparación con los modelos natural y simulado. La **Fig. 1B** muestra el aumento de los niveles de activina-A (pg/ml) en el modelo de Alport de enfermedad renal (Alport200d) en comparación con el modelo natural (WT) y el aumento de los niveles de activina-A tras el tratamiento con BMP-7.

65 La **Fig. 2** muestra el aumento de los niveles de ARNm de activina A (inhibina beta) en el riñón y la aorta de un modelo de ERC-3 (ERC-3 V) en comparación con el modelo simulado. El tratamiento con mActRIIA-Fc disminuye el ARNm de activina A en un modelo de ERC-3 (mActRIIA-Fc).

La **Fig. 3A** muestra el nivel de ActRII en la aorta de ratones naturales. La **Fig. 3B** muestra el nivel de ActRII en la aorta de ratones tratados con simulación. La **Fig. 3C** muestra el aumento del nivel de ActRII en la aorta de ratón de un modelo ERC-3 en comparación con la Fig. 3A y/o la Fig. 3B. La **Fig. 3D** muestra la disminución del nivel de ActRII en la aorta de ratón de un modelo ERC-3 tratado con mActRIIA-Fc en comparación con la Fig. 3C.

La **Fig. 4A** representa los niveles de ARNm de Runx2 en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica en presencia (ERC3+ActRII-Fc) y ausencia (ERC3+v) de tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII. La **Fig. 4B** representa los niveles de ARNm de Alp en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica en presencia (ERC3+ActRII-Fc) y ausencia (ERC3+v) de tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII. La **Fig. 4C** representa los niveles de ARNm de Klotho en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica en presencia (ERC3+ActRII-Fc) y ausencia (ERC3+v) de tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII. La **Fig. 4D** representa los niveles de ARNm de miocardina (MYOCD) en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica en presencia (ERC3+ActRII-Fc) y ausencia (ERC3+v) de tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII. La **Fig. 4E** representa los niveles de ARNm de Sm22-alfa (SM22a) en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica en presencia (ERC3+ActRII-Fc) y ausencia (ERC3+v) de tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII.

La **Fig. 4F** representa los niveles de proteína de alfa-actina de músculo liso, Runx2, Klotho, MYOCD y alfa-tubulina en un modelo de ERC-3 tratada con un inhibidor de la señalización de ActRII (ERC3+ActRII-Fc) en comparación con ERC3 tratada con vehículo solo (ERC3+vehículo) o simulación

La **Fig. 5A** representa la calcificación vascular inducida por ERC-3 tras el tratamiento con un vehículo (Trat. veh.). La **Fig. 5B** muestra la disminución de la calcificación vascular inducida por ERC-3 tras el tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII (Trat. mActRIIA-Fc).

La **Fig. 6A** representa el aumento inducido por ERC-3 en los niveles de calcio (ERC-3 22 sem) en comparación con el modelo natural (wt), simulado, ERC-3 tratado con un vehículo (ERC-3 Veh). El tratamiento con mActRIIA-Fc disminuye la acumulación de calcio inducida por ERC-3 (mActRIIA-Fc). La **Fig. 6B** representa el volumen óseo de ratones naturales (wt), ratones tratados con simulación (simulación), un modelo de ratón de ERC-3 (ERC-3), o un modelo de ratón con ERC-3 tratado con un inhibidor de la señalización de ActRII (mActRIIA-Fc). La **Fig. 6C** representa el número de osteoclastos de ratones naturales (wt), ratones tratados con simulación (simulación), un modelo de ratón de ERC-3 (ERC-3), o un modelo de ratón de ERC-3 tratado con un inhibidor de la señalización de ActRII (mActRIIA-Fc). La **Fig. 6D** representa la superficie de osteoclastos de ratones naturales (wt), ratones tratados con simulación (simulación), un modelo de ratón de ERC-3 (ERC-3), o un modelo de ratón de ERC-3 tratado con un inhibidor de la señalización de ActRII (mActRIIA-Fc).

La **Fig. 7A** representa la estrategia de rastreo del linaje celular realizado en ratones GNZ (Stoller et al, Genesis, 2008) cruzados con ratones Tie2-Cre (también denominados "Tek-Cre") específicos de endotelio. La **Fig. 7B** muestra el rastreo del linaje de células endoteliales en ratones simulados. La **Fig. 7C** muestra el rastreo del linaje de células endoteliales en ratones con ERC. La **Fig. 7D** muestra el rastreo del linaje de células endoteliales en ratones con ERC.

La **Fig. 8** representa la disposición de los sujetos. Nota: "-" indica los sujetos con mediciones de TCc emparejadas en el nivel basal y en el día 225. "++" indica que el sujeto que recibe placebo tiene niveles séricos elevados de eritropoyetina, lo que indica una administración de eritropoyetina fuera de protocolo, "+" indica una violación del protocolo. "‡" indica que el sujeto cumplió los criterios de la regla de interrupción por tensión arterial elevada en el día 29; se interrumpió el tratamiento del estudio y se administró terapia de rescate el día 36, con seguimiento continuado. El sujeto fue aleatorizado por error con una tensión arterial que no cumplía los criterios, basada en una evaluación incompleta, en el nivel inicial.

La **Fig. 9A** representa el porcentaje de sujetos en cada categoría de tratamiento con un aumento del hueso cortical del cuello femoral superior al 2%. La **Fig. 9B** representa el porcentaje de sujetos en cada grupo de tratamiento con cualquier aumento o disminución de la masa de hueso trabecular en la columna lumbar.

La **Fig. 10A** representa el porcentaje de sujetos en cada categoría de tratamiento para el cambio en la puntuación total de Agatston. La **Fig. 10B** representa el porcentaje de sujetos en cada categoría de tratamiento para el cambio en la puntuación total del volumen transformado de la raíz cuadrada.

La **Fig. 11** representa el cambio porcentual en el biomarcador de resorción ósea CTX para sujetos tratados con placebo (PBO), o con un inhibidor de la señalización de ActRII a una dosis de 0,3 mg/kg (0,3) o 0,5 mg/kg (0,5).

La **Fig. 12A** demuestra que los ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R) a 10 mg/kg dos veces por semana por vía subcutánea no tuvieron ningún efecto sobre el aclaramiento de inulina. La **Fig. 12B** demuestra que los ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R) a 10 mg/kg dos veces por semana por vía subcutánea no tuvieron ningún efecto sobre BUN. Las **Fig. 12A** y **Fig. 12B** utilizan un modelo de

calcificación vascular con ERC ablativa como se describe en la Sección 9.4.1.1 se utilizó para producir disminución de la función renal similar al estadio 3 de ERC humana, referida como ERC-3 (ERC-3 V de tratada con vehículo) con una reducción del 70% en la FG en comparación con ratones WT C57B6 (WT) estimado por aclaramientos de inulina y BUN. La **Fig. 12C** demuestra que los ratones deficientes en Col4a5 (Alport) a los 200 días de edad tienen reducciones en el aclaramiento de inulina equivalentes al estadio 3-4 de ERC humana. *p<0,05. La **Fig. 12D** demuestra que los ratones deficientes en Col4a5 (Alport) a los 200 días de edad tienen elevaciones en BUN equivalentes al estadio 3-4 de ERC humana. *p<0,05.

La **Fig. 13** demuestra que la ERC aumenta la activina en la circulación y el riñón y la expresión aórtica de ActRIIA. "WT"=naturales; "simulado"=ratones tratados con simulación; "ERC-3 V"=ratones tratados con vehículo; "ERC-3 R"=ratones tratados con mActRIIA-Fc. La **Fig. 13A** representa la inducción de activina-A circulante por la ERC en un modelo de ratón con ERC-3 *ldlr*^{-/-} alimentado con dieta hiperlipídica como se describe en la Sección 9.4.1.1. La **Fig. 13B** representa la inducción de activina-A circulante por la ERC en ratones con síndrome de Alport como se describe en la Sección 9.4.1.1. La **Fig. 13C** demuestra la expresión de inhibina betaA en riñón y aorta de ratón (la activina-A está formada por homodímeros del gen inhibina betaA). La **Fig. 13D** demuestra los niveles de proteína de inhibina betaA en homogeneizados de riñón. 1, 2 y 3 se refieren a muestras individuales. La **Fig. 13E** representa la inmunohistoquímica de ActRIIA aórtica. Se detectó la expresión de ActRIIA en las aortas de ratones *ldlr*^{-/-} naturales (WT) y con operación simulada (Simulación) alimentados con dieta hiperlipídica, que se estimuló en ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V) o mActRIIA-Fc (ERC-3 mActRIIA-Fc). La barra de escala es de 20 μm. La **Fig. 13F** demuestra que no hay cambios en los niveles circulantes de folistatina en ratones con ERC-3 (tratados con vehículo, ERC-3 V, o con mActRIIA-Fc, ERC-3 R) en comparación con ratones WT y simulados. *p<0,05, ***p<0,005. La **Fig. 13G** demuestra que no hay cambios en los niveles circulantes de folistatina 3 (Fstl3) en ratones con ERC-3 (tratados con vehículo, ERC-3 V, o con mActRIIA-Fc, ERC-3 R) en comparación con ratones WT y simulados. *p<0,05, ***p<0,005.

La **Fig. 14** demuestra la transición endotelial a mesenquimatosa estimulada por la ERC. La **Fig. 14A** representa un diagrama de la estrategia de cría de ratones. El ratón con ROSA26GNZ insertado (ratón GNZ) tiene secuencias con codones de parada, que impiden la expresión del indicador GFP-LacZ localizado nuclearmente (GNZ). Cuando se cruzan con el ratón Tek-Cre, que expresa la recombinasa Cre (Cre) en las células endoteliales, la recombinasa Cre (Cre) elimina la secuencia flanqueada por *loxP* y todas las células de origen endotelial producen la proteína indicadora GNZ. Las **Fig. 14B** a **Fig. 14D** demuestran la doble inmunotinción de la aorta de ratones Tek-Cre/GNZ para el marcador de células endoteliales CD31 y GFP con tinción nuclear DAPI. Las flechas señalan las células endoteliales con doble tinción. En un ratón operado con simulación (Fig. 14B) solo las células endoteliales muestran tinción nuclear y citoplasmática de GFP. En ratones con ERC3, (Fig. 14C y Fig. 14D) además de las células endoteliales, las células de la túnica media aórtica y la adventicia muestran tinción GFP (puntas de flecha). La barra de escala es de 20 μm. La **Fig. 14E** representa que los niveles de ARNm aórtico de Snai1, un factor de transcripción asociado con EnMT (Medici, D., et al., 2008. Molecular Biology of the Cell 19:4875-4887), están aumentados en ratones Alport de 75 días de edad en comparación con ratones naturales (WT). La alfa tubulina sirvió de control de carga. 1 y 2 se refieren a muestras individuales.

La **Fig. 15** representa los efectos de mActRIIA-Fc sobre la calcificación vascular en ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica y con ERC-3. La **Fig. 15A** representa secciones teñidas con rojo alizarina de placas ateroscleróticas aórticas proximales de ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V) y con mActRIIA-Fc (ERC-3 mActRIIA-Fc). La **Fig. 15B** representa los niveles de calcio aórtico en los grupos de ratones: naturales (wt); *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica con operación simulada (simulación); eutanasia para ERC-3 a las 22 semanas, el momento de establecimiento del tratamiento (ERC-3); ERC-3 tratados con vehículo de 22 a 28 semanas (ERC-3 V); ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc, 10 mg/kg subcutáneos dos veces por semana de 22 a 28 semanas (ERC-3 R). Los recuadros representan la mediana (línea en el recuadro) y los intervalos intercuartílicos del percentil 25 a 75. Las barras de error representan 1,5 veces el intervalo intercuartílico. Los grupos se compararon usando el método de ANOVA de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con p<0,05 como nivel de diferencia significativa. * p<0,02, n para cada grupo 8 - 12.

La **Fig. 16** demuestra los efectos de la disminución de la señalización de ActRIIA en la enfermedad cardíaca estimulada por ERC. La **Fig. 16A** demuestra que la ERC-3 en los ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica aumentó el peso del corazón, lo que se invirtió en el grupo de tratamiento con mActRIIA-Fc, en comparación con los ratones tratados con simulación. ERC-3-L se refiere a ratones con ERC-3 tratados con carbonato de lantano. La **Fig. 16B** demuestra que la ERC-3 produjo hipertrofia cardíaca, principalmente del ventrículo izquierdo (centro), que se evitó en el grupo de tratamiento con mActRIIA-Fc (derecha), en comparación con los ratones simulados (izquierda). Tinción tricrómica, barra de escala de 1 mm. La **Fig. 16C** representa la tinción tricrómica de los miocitos del ventrículo izquierdo a mayor aumento, lo que no demuestra evidencias de fibrosis cardíaca. Barra de escala de 20 μm.

La **Fig. 17** demuestra los efectos de ERC-3 sobre la rigidez vascular en ratones con ERC-3 *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica, y la ausencia de un efecto de neutralización de Dkk1. La **Fig. 17A** representa las relaciones presión-diámetro realizadas como se informó anteriormente (Wagenseil, J.E., et al., 2009. Circulation Research 104:1217-1224; Wagenseil, J.E., et al., 2005. AJP - Heart and Circulatory Physiology 289:H1209-

H1217) de las arterias carótidas comunes izquierdas. La **Fig. 17B** representa aortas ascendentes de ratones naturales (WT - 28 sem), con operación simulada (Simulación - 28 sem), ERC-3 (28 semanas) y ERC-3 tratados con anticuerpo monoclonal Dkk1 (Dkk1 mab - 28 sem). Para la **Fig. 17**, negro representa a los ratones WT o con operación simulada, mientras que abierto o gris representa a los ratones con ERC-3. Los valores se presentan como media ± desviación estándar. N = 5-6 ratones para las arterias carótidas, 3-6 para las aortas ascendentes.

La **Fig. 18** demuestra la señalización de ActRIIA en riñón y aorta. La **Fig. 18A** muestra la señalización de activina determinada por inmunoelectrotransferencia de homogeneizados renales (izquierda) y aórticos (derecha) de ratones tratados con simulación, con vehículo para ERC-3 (ERC-3 V) y con mActRIIA-Fc (ERC-3 R). Los niveles de activina aumentaron en los homogeneizados renales, pero no en los homogeneizados aórticos, los receptores de tipo 1 Alk4 (AcvR1B) y Alk2 (AcvR1) estaban presentes en los homogeneizados renales, pero ERC-3 no aumentó la fosforilación de Alk4. Alk4 y Alk1 (AcvRL1) estaban presentes en los homogeneizados aórticos. La ERC-3 aumentó la fosforilación de smad2/3 en riñones pero no en aortas, y aumentó los niveles de col1a1 en riñones. El tratamiento con mActRIIA-Fc redujo los niveles de fosfoSmad2/3 y col1a1 en riñones. En las aortas, la ERC-3 no solo tuvo ningún efecto sobre los niveles de fosfoSmad2/3, sino que tampoco lo tuvo sobre los niveles de fosfoErk 1/2. Los niveles de Runx2 aumentaron por ERC-3 y se normalizaron por mActRIIA-Fc. La **Fig. 18B** representa una disminución de la expresión del ARNm de Klotho en el riñón de ratones con ERC-3 y su corrección mediante el tratamiento con mActRIIA-Fc. La **Fig. 18C** representa la señalización de Wnt marcada por la expresión de la proteína Dkk1 en las inmunoelectrotransferencias de homogeneizados de riñón y aorta de ratones tratados con simulación, con vehículo para ERC-3 y mActRIIA-Fc (izquierda), y el efecto de ERC-3 y mActRIIA-Fc en los niveles plasmáticos de Dkk1 (derecha).

La **Fig. 19** representa los niveles plasmáticos de activina-A en pacientes con ERC de estadio 3 (n=30) frente a donantes sanos (n=10). Los datos se generaron midiendo muestras por duplicado usando un kit de ELISA comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN). El coeficiente de variación fue del 2,7% para el ensayo. *** p<0,002 Prueba de la *t* de Student.

La **Fig. 20** representa los niveles de FGF-23 en ratones naturales (WT), ratones tratados con simulación (simulación), ratones con ERC-3 (ERC-3 V) o ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R).

La **Fig. 21A** representa el nivel de activina A circulante en ratones naturales (WT), ratones con operación simulada (Simulación), ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V) o ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R). * indica p<0,005. La **Fig. 21B** representa el número de osteoblastos/número de perímetro óseo/100 mm para ratones con operación simulada (Simulación), ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V), o ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R). p<0,05 para ERC-3 V frente a ERC-3. La **Fig. 21C** representa el porcentaje de superficie de osteoblastos/superficie ósea de ratones con operación simulada (Simulación), ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V), o ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R). p<0,05 para ERC-3 V frente a ERC-3. La **Fig. 21D** representa la tasa de formación ósea/osteoblasto para ratones con operación simulada (Simulación), ratones ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V) o ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R). p<0,05 para ERC-3 V frente a ERC-3.

La **Fig. 22A** representa la disposición de los sujetos a lo largo del estudio tras el tratamiento con placebo o mActRIIA-Fc a las dosis indicadas. Cada número en el eje y representa a un sujeto individual. La **Fig. 22B** representa las proporciones de sujetos con <15% de progresión en la puntuación total de Agatston en la aorta abdominal tras el tratamiento con placebo o mActRIIA-Fc a las dosis indicadas. La **Fig. 22C** representa las proporciones de sujetos con un aumento >2% en la DMO cortical del cuello femoral tras el tratamiento con placebo o mActRIIA-Fc a las dosis indicadas.

La **Fig. 23A** representa un diagrama esquemático de la proteína de fusión de ratón del dominio extracelular de ActRIIA y el dominio Fc de IgG1 (mActRIIA-Fc). La **Fig. 23B** representa un diseño experimental de los efectos de mActRIIA-Fc sobre la ERC-TMO en ratones *ldlr*-/- alimentados con dieta hiperlipídica. Los ratones en cuatro grupos fueron alimentados con la dieta hiperlipídica comenzando a las 12 semanas (sem) de edad. A las 12 semanas se realizó una operación simulada (SO) o una lesión cortical con electrocauterio (EC). A las 14 semanas, se realizó una SO o una nefrectomía contralateral (NX). A las 22 semanas de vida, se estableció el tratamiento con vehículo o con mActRIIA-Fc, 10 mg/kg subcutáneo dos veces por semana. WT, ratones naturales con dieta de comida para niveles de referencia normales. Simulación, ratones *ldlr*-/- alimentados con dieta hiperlipídica, con operación simulada; ERC-3, ratones con ERC-3 *ldlr*-/- alimentados con dieta hiperlipídica estudiados a las 22 semanas para establecer los niveles de calcio vascular al inicio del tratamiento; ERC-3 V, ratones con ERC-3 *ldlr*-/- alimentados con dieta hiperlipídica tratados con vehículo; ERC-3 R, ratones con ERC-3 *ldlr*-/- alimentados con dieta hiperlipídica tratados con mActRIIA-Fc; los ratones WT, simulados, ERC-3 V y ERC-3 R fueron sacrificados a las 28 semanas de edad.

La **Fig. 24A** representa la expresión de ActRIIA en aortas de ratón como se determina por inmunoelectrotransferencias para ActRIIA en homogeneizados aórticos. La **Fig. 24B** representa la cuantificación por inmunotransferencia de la **Fig. 24A**. Para la cuantificación, n=4, **p<0,01. La **Fig. 24C** representa la detección

inmunofluorescente de ActRIIA en las aortas de ratones simulados. La **Fig. 24D** representa la detección inmunofluorescente de ActRIIA en las aortas de ratones con ERC-3. La ActRIIA se expresó en las CMLV aórticas, pero no se detectó en las células endoteliales. Los niveles de ActRIIA en las CMLV seguían siendo detectables en la ERC en comparación con la simulación. Se usó CD31 (flechas) como marcador de células endoteliales. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala de 20 μ m.

La **Fig. 25A** muestra que la ERC-3 provoca un aumento de la expresión del ARNm de las proteínas osteoblásticas (Runx2 y fosfatasa alcalina (Alpl)), y una disminución de los niveles de la célula 22a del músculo liso aórtico (Tagln), que fueron invertidos por el tratamiento con el mActRIIA-Fc. Los niveles de miocardina aórtica (Myocd) disminuyeron con la ERC, pero no se vieron afectados por mActRIIA-Fc. La **Fig. 25B** muestra inmunoelectrotransferencias para proteínas en homogeneizados aórticos. La Fig. 25C representa la cuantificación por inmunotransferencia de inmunoelectrotransferencia de la Fig. 25B. La ERC provoca una disminución de los niveles de proteína α -actina de células musculares lisas aórticas y un aumento de los niveles de Runx2 osteoblástico, que se invirtieron mediante el tratamiento con mActRIIA-Fc, pero los niveles de miocardina no cambiaron. Para la cuantificación, n=4, **p<0,01.

La **Fig. 26A** representa los efectos de la ERC y del ligando trampa de ActRIIA en la calcificación aórtica en ratones Idlr-/ alimentados con dieta hiperlipídica con ERC-3 mostrando secciones teñidas de placas ateroscleróticas aórticas proximales con rojo de alizarina de vehículo. La **Fig. 26B** representa los efectos de la ERC y del ligando trampa de ActRIIA en la calcificación aórtica en ratones Idlr-/ alimentados con dieta hiperlipídica con ERC-3 y tratados con mActRIIA-Fc, como se muestra por las placas ateroscleróticas aórticas proximales teñidas con rojo de alizarina. La punta de flecha indica la deposición de calcio en la íntima (i); m - túnica media Barra de escala de 100 μ m. La **Fig. 26C** representa los niveles de calcio aórtico en los grupos de ratones: naturales (WT); Idlr-/ simulado alimentados con alto dieta hiperlipídica con operación simulada (simulado); eutanasia por ERC-3 a las 22 semanas, el momento de establecimiento del tratamiento (ERC-3); ERC-3 tratados con vehículo de 22 a 28 semanas (ERC-3 V); ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc, 10 mg/kg subcutáneos dos veces por semana de 22 a 28 semanas (ERC-3 R). Los recuadros representan la mediana (línea en el recuadro) y los intervalos intercuartílicos del percentil 25 a 75. Las barras de error representan 1,5 veces el intervalo intercuartílico. Los grupos se compararon usando el método de ANOVA de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con p<0,05 como nivel de diferencia significativa. * p<0,02; n para cada grupo 8 - 12.

La **Fig. 27A** representa el análisis de la señalización de ActRIIA mediante inmunoelectrotransferencias de homogeneizados aórticos de ratones tratados con simulación, con vehículo para ERC-3 y con mActRIIA-Fc para ERC-3. Inmunotransferencias de homogeneizados de dos aortas de animales de cada grupo. Los niveles de ActRIIA y activina (inhibina β -A) disminuyeron en los homogeneizados aórticos de ratones con ERC-3. Los receptores de tipo 1 de Alk4 (AcvR1B) y Alk1 (AcvRL1) estaban presentes en los homogeneizados aórticos. La ERC-3 redujo la fosforilación de smad2/3 en las aortas, que aumentó por el tratamiento con mActRIIA-Fc. La ERC-3 redujo los niveles de fosfo-Erk 1/2. Los niveles de Runx2 aumentaron por ERC-3 y se normalizaron por tratamiento con mActRIIA-Fc. La **Fig. 27B** representa la cuantificación de p-Smad2/3 mediante inmunotransferencia, n=4, **p<0,01.

La **Fig. 28A** representa una microscopía de inmunofluorescencia de la expresión de beta-catenina en las aortas de ratones naturales. La **Fig. 28B** representa una microscopía de inmunofluorescencia de la expresión de beta-catenina en las aortas de un ratón con ERC. No hubo inmunofluorescencia para beta-catenina en las células musculares lisas vasculares. Hubo expresión de beta-catenina en el endotelio de las aortas de ratones con ERC. Puntas de flecha, colocalización de beta-catenina y CD31 en células endoteliales. Barra de escala de 20 μ m. La **Fig. 28C** representa los niveles de expresión del ARNm de Axin2 aórtico. La **Fig. 28D** representa el análisis de la señalización de Wnt marcada por la expresión de la proteína Dkk1 en inmunoelectrotransferencias de homogeneizados aórticos de ratones tratados con simulación, ERC-3 V y ERC-3 R y por cuantificación de inmunotransferencia, n=4. La **Fig. 28E** representa el efecto de ERC-3V y mActRIIA-Fc sobre los niveles plasmáticos de Dkk1. *p<0,05, ** p<0,01.

La **Fig. 29A** representa los efectos del tratamiento con mActRIIA-Fc sobre los niveles renales de ARNm de Klotho y demuestra que la ERC-3 disminuyó los niveles de expresión génica de Klotho en homogeneizados renales, y que el tratamiento con mActRIIA-Fc los aumentó significativamente en comparación con la ERC-3V. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,005. La **Fig. 29B** representa el análisis de la señalización de ActRIIA mediante inmunoelectrotransferencias de homogeneizados renales de ratones tratados con simulación, vehículo para ERC-3 y con mActRIIA-Fc. Todas las inmunotransferencias son representativas de homogeneizados de 3 o 4 riñones. Los niveles de ActRIIA no se vieron afectados por ERC-3 o mActRIIA-Fc. Los niveles de activina A (inhibina β -A) aumentaron en los homogeneizados renales de ratones con ERC-3 (la cuantificación se muestra en la Fig. 30A-B) y disminuyeron por mActRIIA-Fc. Los receptores de tipo 1 de Alk4 (AcvR1B) y Alk2 (AcvR1) estaban presentes en los homogeneizados renales, pero ERC-3 V o ERC-3 R no afectaron significativamente la fosforilación de Alk4. La ERC-3 aumentó la fosforilación renal de smad2/3 y el tratamiento con mActRIIA-Fc disminuyó la fosfoSmad2/3 renal. La **Fig. 29C** representa la cuantificación por inmunotransferencia de la **Fig. 29B**, *p<0,01.

La **Fig. 30A** representa la tinción tricrómica de secciones de riñón de ratones con ERC-3V tratados con mActRIIA-Fc. La **Fig. 30B** representa la tinción tricrómica de secciones de riñón de ratones con ERC-3V tratados con mActRIIA-Fc. La **Fig. 30C** representa la tinción tricrómica de secciones de riñón de ratones con ERC-3V tratados con mActRIIA-Fc. La **Fig. 30D** representa la tinción tricrómica de secciones de riñón de ratones con ERC-3V tratados con mActRIIA-Fc. Las áreas de fibrosis intersticial están marcadas con puntas de flecha. Los riñones de ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc presentaban una disminución de la fibrosis intersticial. Barra de escala de 50 µm. Véase la Fig. 35 para el marcado de las secciones coronales de riñón entero en cuanto a dónde se tomaron las secciones de fotomicrografía. La **Fig. 30E** representa los efectos de mActRIIA-Fc sobre la proteína urinaria. Hubo proteinuria significativa en los ratones con ERC-3V, la cual fue reducida por el tratamiento con mActRIIA-Fc, *p<0,05.

La **Fig. 31A** representa la inducción de activina-A circulante por la ERC en ratones *ldlr*/- ateroscleróticos alimentados con dieta hiperlipídica con ERC-3. La **Fig. 31B** representa la inducción de activina-A circulante por la ERC en ratones con síndrome de Alport como se describe en el presente documento. La **Fig. 31C** representa la expresión de ARNm de inhibina betaA (*Inhba*) en riñón de ratón (la activina-A está formada por homodímeros de inhibina betaA). La **Fig. 31D** representa inmunoelectrotransferencias para inhibina β-A en homogeneizados de riñón. La **Fig. 31E** representa la cuantificación por inmunotransferencia de la **Fig. 31D**, n=6 para la cuantificación por inmunotransferencia; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

La **Fig. 32A** muestra la inmunotinción de *InhbA* renal en: simulado. La **Fig. 32B** muestra la inmunotinción de *InhbA* renal en ratones con ERC-3 con vehículo. En ratones simulados, células intersticiales peritubulares ocasionales expresan activina-A, pero en ratones con ERC-3 muchas más células intersticiales peritubulares son positivas para activina-A a diferentes niveles de intensidad. Barra de escala de 50 µm.

La **Fig. 33A** y la **Fig. 33B** representan la enfermedad renal crónica en ratones de forma análoga a la enfermedad renal en estadio 3 en humanos. La ERC se estadificó en los modelos de ratón de forma análoga a la estadificación de la ERC humana. Se usó el modelo de calcificación vascular con ERC ablativa descrito en los métodos (Sección 9.10.1) para producir disminución de la función renal similar al estadio 3 de ERC humana, referida como ERC-3 (ERC-3 V de tratada con vehículo) con una reducción del 70% en la FG en comparación con ratones WT C57B6 (WT) estimado por aclaramientos de inulina y BUN. El tratamiento de ratones con ERC-3 con mActRIIA-Fc (ERC-3 R), 10 mg/kg dos veces por semana por vía subcutánea, no tuvo ningún efecto sobre el aclaramiento de inulina ni sobre el BUN.

La **Fig. 34** representa una representación esquemática de la señalización de ActRIIA de Tsuchida et al (Cell Comm. and Signaling, 2009). La activina, miostatina y GDF11 que se unen a los receptores de tipo II, ActRIIA (primario para activina) y ActRIIB (primario para miostatina y GDF11) activan vías de transducción de señales que incluyen la vía canónica a través de smad 2,3.

Las **Fig. 35A** y **Fig. 35B** muestran riñones (tinción tricrómica renal) de ratones con ERC-3 tratados con vehículo. Las **Fig. 35C** y **Fig. 35D** muestran riñones (tinción tricrómica renal) de ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc. Barra de escala de 1 mm. Las cicatrices de la superficie cortical de la lesión por electrocauterización están marcadas con puntas de flecha. Las flechas designan el punto desde el que se tomaron las fotomicrografías de alta potencia de la Fig. 36. Barra de escala de 1 mm.

La **Fig. 36A** representa la ausencia de cambios en los niveles circulantes de folistatina en ratones con ERC-3 en comparación con ratones WT y simulados. La **Fig. 36B** representa la ausencia de cambios en los niveles circulantes de 3 similar a la folistatina (*Fstl3*) en ratones con ERC-3 en comparación con ratones WT y simulados.

La **Fig. 37** representa los niveles de las proteínas que interactúan con el receptor de activina (Arip1 y Arip2) en los tejidos de los ratones con ERC-3. Arip1 se expresa fuertemente en los restos de riñón de los ratones con ERC-3, más del doble que la expresión de Arip2. Arip1 se expresa a niveles bajos en las aortas de ratones con ERC-3, mientras que la expresión de Arip2 en la aorta es el doble que la de Arip1.

8. DESCRIPCIÓN DETALLADA

55

8.1 VISIÓN GENERAL

La invención proporciona un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una dosis farmacéuticamente eficaz de dicho inhibidor de la señalización de ActRII,

en donde el sujeto ha sido seleccionado basándose en:

- 65 (a) niveles elevados del factor de transcripción 2 relacionado con runt (*Runx2*) en comparación con los niveles de *Runx2* en una población de referencia;

(b) niveles elevados del homólogo 1 de Snail (Snail) en comparación con los niveles de Snai1 en una población de referencia;

5 (c) niveles elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles de fosfoSmad2 en una población de referencia;

(d) niveles elevados de colágeno de tipo 1 alfa 1 (collal) en comparación con los niveles de collal en una población de referencia;

10 (e) niveles elevados de telopeptido de colágeno de tipo 1 carboxiterminal (CTX) en comparación con los niveles de CTX en una población de referencia;

(f) niveles elevados de Osterix en comparación con los niveles de Osterix en una población de referencia;

15 (g) niveles reducidos de actina alfa de músculo liso (alfa-SMA) en comparación con los niveles de alfa-SMA en una población de referencia;

(h) niveles reducidos de miocardina (MYOCD) en comparación con los niveles de MYOCD en una población de referencia;

20 (i) niveles reducidos de proteína inhibidora del eje 2 (Axin2) en comparación con los niveles de Axin2 en una población de referencia;

(j) niveles reducidos de proteína 22-alfa de músculo liso (Sm22-alfa) en comparación con los niveles de Sm22-alfa en una población de referencia;

25 (k) niveles elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles de fosfoSmad3 en una población de referencia; y/o

(l) niveles elevados de proteínas urinarias en comparación con los niveles de proteína urinaria en una población de referencia,

en donde la población de referencia:

35 (i) consiste en personas sanas;

(ii) consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que el sujeto;

(iii) consiste en personas sin enfermedad cardiovascular;

40 (iv) consiste en personas sin calcificación vascular;

(v) consiste en personas sin enfermedad renal;

(vi) consiste en personas sin enfermedad renal crónica;

45 (vii) consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial; o

(viii) consiste en personas sin hipertrofia ventricular izquierda, y

50 en donde la enfermedad es:

(a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica en estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica con enfermedad mineral y ósea;

55 (b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;

(c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;

60 (d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o

(e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.

65 La invención proporciona además un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende:

- (a) administrar al sujeto una dosis inicial de un inhibidor de la señalización de ActRII;
- (b) tomar una primera medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto;
- 5 (c) después de un periodo de tiempo, tomar una segunda medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto; y
- 10 (d) administrar al sujeto una dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII, y en donde la dosis ajustada se basa en el cambio detectado entre la primera medición y la segunda medición, tratando y/o previniendo así dicha enfermedad,

y en donde dicha enfermedad es:

- 15 (a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica de estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica mineral y ósea; o
- (b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;
- 20 (c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;
- (d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o
- (e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.

25 inhibidor de la señalización, como un indicador de la eficacia del tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII, o como un indicador de la dosis adecuada para el tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII. Los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa también pueden utilizarse para identificar enfermedades y/o afecciones para el tratamiento y/o prevención con un inhibidor de la señalización de ActRII. Un inhibidor de la señalización de ActRII usado en los métodos descritos en el presente documento puede ser un inhibidor de la señalización de ActRIIA y/o de la señalización de ActRIIB, tal como cualquiera de los inhibidores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. En una realización preferida, un inhibidor de la señalización de ActRII es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIA y el dominio Fc de IgG1 humano ("ActRIIA-Fc", por ejemplo, SEQ ID NO:7).

35 En el presente documento se desvela un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, y/o enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de enfermedad renal, niveles elevados de rigidez arterial (por ejemplo, como se indica por la disminución de la distensibilidad vascular), y/o hipertrofia ventricular izquierda (HVI), incluyendo enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial y/o HVI, en donde el método comprende administrar un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) a un sujeto que necesita el tratamiento y/o prevención del mismo. En ciertos ejemplos, el sujeto es un sujeto renal. El inhibidor de la señalización de ActRII puede ser un inhibidor de la señalización de ActRIIA y/o ActRIIB.

40 45 En particular, en el presente documento se proporciona un inhibidor de la señalización de ActRII para su uso en métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de enfermedad renal, niveles elevados de rigidez arterial y/o hipertrofia ventricular izquierda (HVI) mediante el uso del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1,

50 55 Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, como un indicador de la población de pacientes, como un indicador de la capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento y/o prevención con un ActRII.

60 65 Los métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y Osterix están elevados, y los niveles de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA y Sm22-alfa están reducidos en un modelo de ratón de calcificación vascular inducida por enfermedad renal crónica en comparación con un ratón natural. Además, sin estar limitado a teoría, el atrapamiento de ligando por mActRIIA-Fc reduce la calcificación vascular en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica (ratones Ildr^{-/-}, dieta hiperlipídica). Como se muestra en los Ejemplos presentados en el presente documento (véase la Sección 9), el tratamiento de ratones con enfermedad renal crónica con mActRIIA-Fc redujo la calcificación vascular, redujo los niveles de calcio aórtico, redujo los niveles de fosfoSmad3, redujo los niveles de proteína urinaria, redujo los niveles de fosfoSmad2, redujo los niveles de Dkk1, redujo los niveles de Runx2, redujo los niveles de Alp, redujo los niveles de BSAP, redujo los niveles de CTX y redujo los niveles de Osterix, y elevó los niveles de Klotho, elevó los niveles de alfa-SMA, elevó los niveles de Axin2 y elevó los niveles de Sm22-alfa. Además, los métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de que la disminución de la calcificación vascular en ratones con enfermedad renal crónica tras el tratamiento con

mActRIIA-Fc se correlaciona con una disminución de los niveles de Dkk1, fosfoSmad2, Runx2, Alp, BSAP, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, y un aumento de los niveles de Klotho, alfa-SMA, Axin2 y/u Sm22-alfa (véanse los Ejemplos, Sección 9). En conjunto, los datos presentados en el presente documento indican que los niveles de Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa pueden identificar qué sujetos pueden responder a ActRIIA-Fc y/o pueden usarse para monitorizar la respuesta clínica a un inhibidor de la señalización de ActRII y/o seleccionar poblaciones de pacientes diana. Los datos presentados en el presente documento también indican que ActRIIA-Fc (por ejemplo, mActRIIA-Fc, o ActRIIA-hFc como SEQ ID NO:7) es útil en el tratamiento de la calcificación vascular asociada a enfermedad renal crónica. Además, los datos presentados en el presente documento también indican que ActRIIA-Fc (por ejemplo, mActRIIA-Fc, o ActRIIA-hFc como SEQ ID NO:7) es útil en el tratamiento de enfermedades asociadas a niveles elevados de Snail, fosfoSmad2, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, o enfermedades asociadas a niveles reducidos de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA y/o Sm22-alfa. Por último, los datos presentados en el presente documento también indican que ActRIIA-Fc (por ejemplo, mActRIIA-Fc, o hActRIIA-hFc como SEQ ID NO:7) es útil para disminuir los depósitos de calcio en el ateroma aórtico, reducir los niveles de calcio aórtico, invertir el aumento del peso del corazón inducido por la ERC y disminuir la fibrosis renal, y por consiguiente, es útil en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Los hallazgos descritos en el presente documento, ilustrados en los Ejemplos (véase la Sección 9), indican que la detección de los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, ActRIIA, Axin2 o Sm22-alfa puede usarse (i) como marcador (por ejemplo, biomarcador sérico) del grado de calcificación vascular en un sujeto, (ii) como marcador para medir la respuesta del sujeto a un inhibidor de la señalización de ActRII (como ActRIIA-Fc), o (iii) para evaluar los efectos farmacodinámicos de un inhibidor de la señalización de ActRII (como ActRIIA-Fc) en un sujeto tras el tratamiento, en donde el sujeto es un sujeto con enfermedad cardiovascular, calcificación vascular, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular, y/o enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal. Así, en ciertas realizaciones, Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento como un indicador de eficacia de ActRIIA-Fc (por ejemplo, ActRIIA-hFc como SEQ ID NO:7) y/o como un indicador de ausencia de respuesta al tratamiento con ActRIIA-Fc (por ejemplo, ActRIIA-hFc como SEQ ID NO:7). Además, como se describe en el presente documento, Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa pueden usarse como marcadores moleculares fiables para evaluar la eficacia del tratamiento en el tiempo de ActRIIA-Fc (por ejemplo, ActRIIA-hFc como SEQ ID NO:7). Además, en una realización específica, el método comprende la detección del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa en la sangre (por ejemplo, detectar una expresión anormal en una enfermedad asociada con una función alterada de las células musculares lisas vasculares), y administración de un inhibidor de la señalización de ActRII, como ActRIIA-Fc, en una dosis dependiente del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es sotatercept (SEQ ID NO: 7; véase, por ejemplo, la Sección 9). Sotatercept es un ligando trampa de activina que es útil en los métodos descritos en el presente documento (véase la Sección 8).

8.2 ABREVIATURAS

Tal como se utiliza en el presente documento, "Snai 1" o "Snail" se refieren al homólogo 1 de snail. Véase, por ejemplo, Twigg y Wilkie, 1999, Hum Genet. 105(4):320-326, el número de acceso NM_005985.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Snail humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_005976.2 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Snail humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "fosfoSmad3" se refiere a madres fosforiladas contra el homólogo decapentapléjico 3. Véase, por ejemplo, Matsuzaki, 2013, Cytokine Growth Factor Rev, 24(4):385-399. El número de acceso NM_005902.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de fosfoSmad3 humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_005893.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de fosfoSmad3 humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "fosfoSmad2" se refiere a madres fosforiladas contra el homólogo decapentapléjico 2. Véase, por ejemplo, Matsuzaki, 2013, Cytokine Growth Factor Rev, 24(4):385-399. El número de acceso NM_001003652.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de fosfoSmad2 humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001003652.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de fosfoSmad2 humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Dkk1" se refiere a la proteína 1 relacionada con dickkopf. Véase, por ejemplo, Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763. El número de acceso NM_012242.2 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Dkk1 humana a modo de ejemplo. El número de acceso NP _036374.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Dkk1 humana a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "col1a1" se refiere al colágeno de tipo 1, alfa 1. Véase, por ejemplo, Korkko et al., 1998, Am. J. Hum. Genet., 62:98-110. El número de acceso XM_005257059.2 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de col1a1 humano a modo de ejemplo. El número de acceso XP_005257116.2 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de col1a1 humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Runx2" se refiere al factor de transcripción 2 relacionado con runt. Véase, por ejemplo, Komori, 2010, Adv Exp Med Biol, 658:43-49. El número de acceso NM_001145920.2 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Runx2 humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001139392.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Runx2 humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Alp" o "AlpI" se refiere a la fosfatasa alcalina. Tal como se utiliza en el presente documento, "BSAP" se refiere a la fosfatasa alcalina específica del hueso. Véase, por ejemplo, Martins et al., 2013, Bone, 56(2):390-397. El número de acceso NM_000478.4 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Alp humana a modo de ejemplo. El número de acceso NP_000469.3 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Alp humana a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "CTX" se refiere a telopeptídos carboxiterminales del colágeno de tipo I. Véase, por ejemplo, Rosen et al, 2000, Calcif Tissue Int. 66(2): 100-103.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Osterix" se refiere a Osterix, también conocido como factor de transcripción Sp7. Véase, por ejemplo, Cao et al., 2005, Cancer Res. 65(4):1124-1128. El número de acceso NM_001173467.2 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Osterix humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001166938.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Osterix humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Klotho" se refiere a Klotho. Véase, por ejemplo, Matsumura et al. 1998, Biochem Biophys Res Commun, 242:626-630. El número de acceso NM_004795.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Klotho humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_004786.2 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Klotho humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "alfa-SMA" o "aSMA" o "α-SMA" se refiere a la actina alfa de músculo liso. Véase, por ejemplo, Nowak et al., 1999, Nat. Genet. 23:208-212. El número de acceso NM_001100.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de alfa-SMA humana a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001091.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de alfa-SMA humana a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "MYOCD" se refiere a la miocardina. Véase, por ejemplo, Imamura et al., 2010, Gene, 464:1-10. El número de acceso NM_001146312.2 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de MYOCD humana a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001139784.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de MYOCD humana a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Sm22-alfa" o "Sm22a" o "Sm22-a" se refiere a la proteína 22 alfa del músculo liso, también conocida como "transgelina", "Tagln" o "Tag1n1". Véase, por ejemplo, Camoretti-Mercado, 1998, Genomics, 49:452-457. El número de acceso NM_001001522.1 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Sm22-alfa humana a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001001522.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de Sm22-alfa humana a modo de ejemplo.

Como se usa en el presente documento, "ActRII" se refiere a receptor de tipo II de activina. Como se usa en el presente documento, "ActRIIA" se refiere a receptor de tipo IIA de activina. Véase, por ejemplo, Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982. El número de acceso NM_001278579.1 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de ActRIIA humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001265508.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de ActRIIA humano a modo de ejemplo. Como se usa en el presente documento, "ActRIIB" se refiere a receptor de tipo IIB de activina. Véase, por ejemplo, Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108. El número de acceso NM_001106.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de ActRIIB humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001097.2 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de ActRIIB humano a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Axin2" se refiere al inhibidor del eje 2. El número de acceso NM_004655.3 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de Axin2 humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_004646.3 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos humana a modo de ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "mActRIIB-Fc" o "ActRIIB-mFc" se refiere a una proteína de fusión de receptor de tipo IIA de activina-IgG1 de ratón. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.173.601. Como se usa en el presente documento, "mActRIIB-Fc" o "ActRIIB-mFc" se refiere a una proteína de fusión de receptor de tipo IIB de activina-IgG1 de ratón. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.173.601. Como se usa en el presente documento, "hActRIIA-Fc" o "ActRIIA-hFc" se refiere a una proteína de fusión de receptor de tipo IIA de activina-IgG1 humana. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.173.601. Como se usa en el presente documento, "hActRIIB-Fc" o "ActRIIB-hFc"

se refiere a una proteína de fusión de receptor de tipo IIB de activina-IgG1 humana. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.173.601.

Como se usa en el presente documento, "HVI" se refiere a hipertrofia ventricular izquierda.

5

8.3 MÉTODOS DE TRATAMIENTOS Y/O PREVENCIÓN

8.3.1 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y/O CALCIFICACIÓN VASCULAR

- 10 En el presente documento se desvelan métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de niveles elevados de rigidez arterial, niveles elevados de rigidez arterial, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda, y/o enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una dosis farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina). En ciertos ejemplos, el sujeto es un sujeto renal. En ciertos otros ejemplos, al sujeto se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertos otros ejemplos, al sujeto no se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo.
- 15 20 En ciertas realizaciones, el sujeto tiene niveles y/o actividad elevados de Runx2 en comparación con los niveles y/o actividad de Runx2 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de Snai1 en comparación con los niveles y/o actividad de Snai1 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles y/o actividad de fosfoSmad2 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles y/o actividad de fosfoSmad3 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de proteína urinaria en comparación con los niveles y/o actividad de proteína urinaria en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de col1a1 en comparación con los niveles y/o actividad de col1a1 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de CTX en comparación con los niveles y/o actividad de CTX en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de Osterix en comparación con los niveles y/o actividad de Osterix en una población de referencia, disminución de los niveles y/o actividad de alfa-SMA en comparación con los niveles y/o actividad de alfa-SMA en una población de referencia, disminución de los niveles y/o actividad de MYOCD en comparación con los niveles y/o actividad de MYOCD en una población de referencia, y/o disminución de los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en comparación con los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en una población de referencia.
- 25 30 35 En ciertas realizaciones, el sujeto tiene niveles y/o actividad elevados de Runx2 en comparación con los niveles y/o actividad previos de Runx2 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de Snail en comparación con los niveles y/o actividad previos de Snail en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de fosfoSmad2 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de fosfoSmad3 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de proteína urinaria en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de proteína urinaria en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de collal en comparación con los niveles y/o actividad previos de collal en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de CTX en comparación con los niveles y/o actividad previos de CTX en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de Osterix en comparación con los niveles y/o actividad previos de Osterix en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de alfa-SMA en comparación con los niveles y/o actividad previos de alfa-SMA en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de MYOCD en comparación con los niveles y/o actividad previos de MYOCD en el sujeto, y/o disminución de los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en comparación con los niveles y/o actividad previos de Sm22-alfa en el sujeto. En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad previos de Runx2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Snail en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de fosfoSmad2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de fosfoSmad3 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de proteína urinaria en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de collal en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de CTX en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Osterix en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de alfa-SMA en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de MYOCD en el sujeto, y/o los niveles y/o actividad previos de Sm22-alfa en el sujeto son los niveles respectivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24 o 48 meses antes de la aparición de los síntomas o del diagnóstico de (i) enfermedad cardiovascular; (ii) calcificación vascular; (iii) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular; (iv) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal; (v) niveles elevados de rigidez arterial; y/o hipertrofia ventricular izquierda (HVI).
- 40 45 50 55 En ciertas realizaciones, el sujeto es tratado según los métodos descritos en 8.3.4. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular en el sujeto se analiza midiendo las puntuaciones de Agatston como se describe en la Sección 8.6.
- 60 En ciertas realizaciones, un sujeto que se va a tratar con los métodos proporcionados en el presente documento tiene los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa como se describe en la Sección 8.6. Así, en ciertas realizaciones específicas, el método comprende (i) seleccionar un sujeto basándose en los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa como se describe en la Sección 8.6; y (ii) administrar una dosis farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina). En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular. En una realización preferida, el sujeto tiene calcificación vascular. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad

cardiovascular asociada a y/o resultante de la calcificación vascular. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la enfermedad renal. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad renal. En ciertas otras realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas otras realizaciones, al sujeto no se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular en el sujeto se analiza midiendo las puntuaciones de Agatston como se describe en la Sección 8.6. En realizaciones específicas, al sujeto se le han diagnosticado niveles elevados de rigidez arterial. En una realización específica, al sujeto se le ha diagnosticado HVI. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de HVI.

En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa se determinan como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel y/o actividad de proteína de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel y/o actividad de ARNm de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD y/o Axin2, alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y col1a1 están en el riñón. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de la activina están en el suero. En ciertas realizaciones, los niveles de activina son elevados en el sujeto con respecto a una población de referencia. En ciertas realizaciones, los niveles de folistatina en el sujeto son aproximadamente iguales a los niveles de folistatina en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, la población de referencia es una población como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto como se describe en la Sección 8.4.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es ActRIIA-Fc, tal como ActRIIA-hFc (por ejemplo, SEQ ID NO:7). En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es un inhibidor de la señalización de ActRII como se describe en la Sección 8.5.

En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra a una frecuencia como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra como se describe en la Sección 8.7.

En ciertas realizaciones, los métodos se utilizan en combinación con un segundo agente farmacéuticamente activo, como se describe en la Sección 8.8.

En ciertas realizaciones, "tratar", "tratamiento" o "tratando", en el contexto de la enfermedad cardiovascular o la enfermedad renal crónica, incluye la mejora de al menos un síntoma de la enfermedad cardiovascular o la enfermedad renal crónica, respectivamente.

Como reconocerá un experto en la materia, los niveles y/o actividad de uno o más de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria pueden compararse respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. Así, en ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de uno de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de dos de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de tres de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de cuatro de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de cinco de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de seis de Runx2, Alp; Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de siete de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con

su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de ocho de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, collal, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de nueve de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de diez de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de once de Runx2, Alp; Snail, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de cada uno de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, Axin2 y proteína urinaria se compara con su nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente.

8.3.2 ENFERMEDADES ASOCIADAS A SNAI1, FOSFOSMAD2, DKK1, COL1A1, ACTIVINA (POR EJEMPLO, ACTIVINA LIBRE), RUNX2, ALP, BSAP, CTX, OSTERIX, KLOTHO, ALFA-SMA, MYOCD, FOSFOSMAD3, PROTEÍNA URINARIA, ACTRIIA, AXIN2 Y/O SM22-ALFA

En el presente documento se desvelan métodos de tratamiento y/o prevención de una o más enfermedades asociadas a Snai1, fosfoSmad2, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, que comprenden administrar al sujeto una dosis farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina).

El sujeto puede ser un sujeto tal y como se describe en la Sección 8.4.

El inhibidor de la señalización de ActRII puede ser ActRIIA-Fc, tal como ActRIIA-hFc (por ejemplo, SEQ ID NO:7). El inhibidor de la señalización de ActRII puede ser un inhibidor de la señalización de ActRII como se describe en la Sección 8.5.

La dosis farmacéuticamente eficaz puede ser una dosis como se describe en la Sección 8.7. La dosis farmacéuticamente eficaz puede ser una dosis inicial. La dosis farmacéuticamente eficaz puede administrarse a una frecuencia como se describe en la Sección 8.7. La dosis farmacéuticamente eficaz puede ser administrada como se describe en la Sección 8.7. La dosis farmacéuticamente eficaz puede ajustarse en función del nivel y/o actividad de ciertos biomarcadores descritos en el presente documento.

Los métodos pueden utilizarse en combinación con un segundo agente farmacéuticamente activo, como se describe en la Sección 8.8.

8.3.3 ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA - TRASTORNO MINERAL/ÓSEO

En ciertas realizaciones, en el presente documento se proporciona un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) para su uso en métodos de tratamiento de la enfermedad renal crónica - trastorno mineral óseo en un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene calcificación vascular. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la calcificación vascular. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la enfermedad renal. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto renal. En ciertas otras realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas otras realizaciones, al sujeto no se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo.

En ciertas realizaciones, el sujeto tiene niveles y/o actividad elevados de Runx2 en comparación con los niveles y/o actividad de Runx2 en una población de referencia, niveles elevados y/o niveles y/o actividad elevados de Snail en comparación con los niveles y/o actividad de Snail en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles y/o actividad de fosfoSmad2 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles y/o actividad de fosfoSmad3 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de proteína urinaria en comparación con los niveles y/o actividad de proteína urinaria en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de coll a1 en comparación con los niveles y/o actividad de coll a1 en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de CTX en comparación con los niveles y/o actividad de CTX en una población de referencia, niveles y/o actividad elevados de Osterix en comparación con los niveles y/o actividad de Osterix en una población de referencia, disminución de los niveles y/o actividad de alfa-SMA en comparación con los niveles y/o actividad de alfa-SMA en una población de referencia, disminución de los niveles y/o actividad de MYOCD en comparación con los niveles y/o actividad de MYOCD en una población de referencia, y/o disminución de los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en comparación con los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en una población de referencia. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA y/o MYOCD están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o col1a1

están en el riñón. En ciertas realizaciones, los niveles de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD y/o alfa-SMA están en la aorta.

En ciertas realizaciones, el sujeto tiene niveles y/o actividad elevados de Runx2 en comparación con los niveles y/o actividad previos de Runx2 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de Snail en comparación con los niveles y/o actividad previos de Snail en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de fosfoSmad2 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de fosfoSmad3 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de proteína urinaria en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de proteína urinaria en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de collal en comparación con los niveles y/o actividad previos de collal en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de CTX en comparación con los niveles y/o actividad previos de CTX en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de Osterix en comparación con los niveles y/o actividad previos de Osterix en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de alfa-SMA en comparación con los niveles y/o actividad previos de alfa-SMA en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de MYOCD en comparación con los niveles y/o actividad previos de MYOCD en el sujeto, y/o disminución de los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en comparación con los niveles y/o actividad previos de Sm22-alfa en el sujeto. En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad previos de Runx2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Snail en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de fosfoSmad2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de fosfoSmad3 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de proteína urinaria en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de collal en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de CTX en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Osterix en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de alfa-SMA en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de MYOCD en el sujeto, y/o los niveles y/o actividad previos de Sm22-alfa en el sujeto son los niveles respectivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24 o 48 meses antes de la aparición de los síntomas o del diagnóstico de ERC-TMO.

En ciertas realizaciones, el sujeto es tratado según los métodos descritos en la Sección 8.3.4. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular en el sujeto se analiza midiendo las puntuaciones de Agatston como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, un sujeto que se va a tratar tiene los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa como se describe en la Sección 8.6. Así, en ciertas realizaciones específicas, el método comprende (i) seleccionar un sujeto basándose en los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa como se describe en la Sección 8.6; y (ii) administrar una dosis farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina). En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular. En una realización preferida, el sujeto tiene calcificación vascular. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la calcificación vascular. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la enfermedad renal. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad renal. En ciertas otras realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas otras realizaciones, al sujeto no se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En una realización específica, el sujeto tiene niveles elevados de rigidez arterial. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial. En una realización específica, el sujeto tiene una HVI. En una realización específica, el sujeto tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de HVI.

En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa se determinan como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA, Axin2 y MYOCD están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria y coll al están en el riñón. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de la activina están en el suero. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa es el nivel y/o actividad de proteína de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa es el nivel y/o actividad de ARNm de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, los niveles de folistatina en el sujeto son aproximadamente iguales a los niveles de folistatina en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, la población de referencia es una población como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto como se describe en la Sección 8.4.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es ActRIIA-Fc, tal como ActRIIA-hFc (por ejemplo, SEQ ID NO:7). En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es un inhibidor de la señalización de ActRII como se describe en la Sección 8.5.

En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra a una frecuencia como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz se administra como se describe en la Sección 8.7.

En ciertas realizaciones, los métodos se utilizan en combinación con un segundo agente farmacéuticamente activo, como se describe en la Sección 8.8.

10 En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar al sujeto una dosis farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina), en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía subcutánea al sujeto 0,13 mg/kg de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 14 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía subcutánea al sujeto 0,26 mg/kg de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 14 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía subcutánea al sujeto 0,3 mg/kg de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 28 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía subcutánea al sujeto 0,5 mg/kg de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 28 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía subcutánea al sujeto 0,7 mg/kg de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 28 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía intravenosa al sujeto 0,1 mg/kg de una dosis farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 14 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de la enfermedad renal terminal en un sujeto comprenden administrar por vía subcutánea al sujeto 0,2 mg/kg de un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) en un intervalo de una vez cada 14 días, en donde el sujeto está en hemodiálisis, y en donde al sujeto se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7).

40 8.3.4 DOSIS AJUSTADA

En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa pueden usarse además (i) para evaluar la dosis adecuada para un sujeto, en donde el sujeto es candidato a ser tratado o está siendo tratado con un inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina); (ii) para evaluar si se debe ajustar la dosis del inhibidor de la señalización de ActRII durante el tratamiento; y/o (iii) para evaluar una dosis de mantenimiento adecuada del inhibidor de la señalización de ActRII. Si el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa es mayor o menor que el nivel y/o actividad en una población de referencia, la dosis con un inhibidor de la señalización de ActRII puede iniciarse, aumentarse, reducirse, retrasarse o finalizarse dependiendo del nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de enfermedad renal, ERC-TMO, niveles elevados de rigidez arterial, HVI, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de niveles elevados de rigidez arterial, y/o enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de HVI, en un sujeto comprenden (i) administrar al sujeto una dosis inicial de un inhibidor de la señalización de ActRII; (ii) tomar una primera medición del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto; (iii) tras un periodo de tiempo, tomar una segunda medición del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto; y (iv) administrar al sujeto una dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es ActRIIA-Fc, tal como ActRIIA-hFc (por ejemplo, SEQ ID NO:7). En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII es un inhibidor de la señalización de ActRII como se describe en la Sección 8.5. En ciertas otras realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas otras realizaciones, al sujeto no se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular en el sujeto se analiza midiendo las puntuaciones de Agatston como se

describe en la Sección 8.6.6. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se basa en el cambio detectado entre la primera medición y la segunda medición.

En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa se determinan como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel y/o actividad de proteína de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel y/o actividad de ARNm de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA, MYOCD o Axin2 están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y collal están en el riñón. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de la activina están en el suero. En ciertas realizaciones, los niveles de activina son elevados en el sujeto con respecto a una población de referencia. En ciertas realizaciones, los niveles de folistatina son normales en el sujeto con respecto a una población de referencia. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular en el sujeto se analiza midiendo las puntuaciones de Agatston como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la población de referencia es una población como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto como se describe en la Sección 8.4.

En ciertas realizaciones, la dosis inicial es una dosis como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra a una frecuencia como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra como se describe en la Sección 8.7.

En ciertas realizaciones, la primera medición y/o la segunda medición se toman como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la primera medición se toma antes del inicio del tratamiento. En ciertas realizaciones, la primera medición se toma después del inicio del tratamiento o en un plazo máximo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o dos meses del mismo. En ciertas realizaciones, la segunda medición se toma inmediatamente después del inicio del tratamiento o en un plazo máximo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses del mismo.

En ciertas realizaciones, la dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII es mayor que la dosis inicial si el nivel y/o actividad de Runx2 es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de Runx2 en una población de referencia, el nivel y/o actividad de Snail es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de Snail en una población de referencia, el nivel y/o actividad de fosfoSmad2 es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de fosfoSmad2 en una población de referencia, el nivel y/o actividad de fosfoSmad3 es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de fosfoSmad3 en una población de referencia, el nivel y/o actividad de proteína urinaria es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de proteína urinaria en una población de referencia, el nivel y/o actividad de col1a1 es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de collal en una población de referencia, el nivel y/o actividad de CTX es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de CTX en una población de referencia, el nivel y/o actividad de Osterix es elevado en comparación con el nivel y/o actividad de Osterix en una población de referencia, el nivel y/o actividad de alfa-SMA es reducido en comparación con el nivel y/o actividad de alfa-SMA en una población de referencia, el nivel y/o actividad de MYOCD disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de MYOCD en una población de referencia, el nivel y/o actividad de Axin2 disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de Axin2 en una población de referencia, y/o el nivel y/o actividad de Sm22-alfa disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de Sm22-alfa en una población de referencia. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de alfa-SMA, Axin2 y/o Sm22-alfa son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA, Axin2 y MYOCD están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y collal están en el riñón. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de la activina están en el suero.

En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es una dosis como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra a una frecuencia como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra como se describe en la Sección 8.7.

En ciertas realizaciones, el sujeto tiene niveles y/o actividad elevados de Runx2 en comparación con los niveles y/o actividad previos de Runx2 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de Snai1 en comparación con los niveles y/o

- actividad previos de Snai1 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de fosfoSmad2 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de fosfoSmad3 en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de proteína urinaria en comparación con los niveles y/o actividad anteriores de proteína urinaria en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de collal en comparación con los niveles y/o actividad previos de collal en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de CTX en comparación con los niveles y/o actividad previos de CTX en el sujeto, niveles y/o actividad elevados de Osterix en comparación con los niveles y/o actividad previos de Osterix en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de alfa-SMA en comparación con los niveles y/o actividad previos de alfa-SMA en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de MYOCD en comparación con los niveles y/o actividad previos de MYOCD en el sujeto, disminución de los niveles y/o actividad de Axin2 en comparación con los niveles y/o actividad previos de Axin2 en el sujeto, y/o disminución de los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en comparación con los niveles y/o actividad previos de Sm22-alfa en el sujeto. En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad previos de Runx2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Alp en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Snail en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de fosfoSmad2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de fosfoSmad3 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de proteína urinaria en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de CTX en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Osterix en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Klotho en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de alfa-SMA en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de MYOCD en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Axin2 en el sujeto, los niveles y/o actividad previos de Axin2 en el sujeto, y/o los niveles y/o actividad previos de Sm22-alfa en el sujeto son los niveles respectivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24 o 48 meses antes de la aparición de los síntomas o del diagnóstico de (i) enfermedad cardiovascular; (ii) calcificación vascular; (iii) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular; (iv) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal; (v) ERC-TMO; (vi) niveles elevados de rigidez arterial; (vii) HVI; (viii) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial; y/o (ix) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de HVI.
- En ciertas realizaciones, la dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, un ligando trampa de activina) es menor que la dosis inicial si el nivel y/o actividad de Runx2 disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de Runx2 en una población de referencia, el nivel y/o actividad de Snail disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de Snail en una población de referencia, el nivel y/o actividad de fosfoSmad2 disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de fosfoSmad2 en una población de referencia, el nivel y/o actividad de fosfoSmad3 disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de fosfoSmad3 en una población de referencia, el nivel y/o actividad de proteína urinaria disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de proteína urinaria en una población de referencia, el nivel y/o actividad de collal disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de collal en una población de referencia, el nivel y/o actividad de CTX disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de CTX en una población de referencia, el nivel y/o actividad de Osterix disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de Osterix en una población de referencia, el nivel y/o actividad de alfa-SMA aumenta en comparación con el nivel y/o actividad de alfa-SMA en una población de referencia, el nivel y/o actividad de MYOCD aumenta en comparación con el nivel y/o actividad de MYOCD en una población de referencia, el nivel y/o actividad de Axin2 aumenta en comparación con el nivel y/o actividad de Axin2 en una población de referencia, y/o el nivel y/o actividad de Sm22-alfa aumenta en comparación con el nivel y/o actividad de Sm22-alfa en una población de referencia. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y/o alfa-SMA están en un tejido. En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Osterix, Sm22-alfa, alfa-SMA, Axin2 y MYOCD están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Axin2 y col1a1 están en el riñón. En ciertas realizaciones, los niveles de Snail, fosfoSmad2, collal, Runx2, CTX, Osterix, Sm22-alfa, MYOCD, Axin2 y/o alfa-SMA están en la aorta.
- En ciertas realizaciones, la población de referencia es una población como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es una dosis como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra a una frecuencia como se describe en la Sección 8.7. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra como se describe en la Sección 8.7
- En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento se utilizan en combinación con un segundo agente farmacéuticamente activo, como se describe en la Sección 8.8.
- Como reconocerá un experto en la materia, los niveles y/o actividad de uno o más de Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria pueden compararse independientemente y respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente, tal como se describe anteriormente en la Sección 8.3.1.

8.4 POBLACIONES DE PACIENTES

- Los sujetos tratados según los métodos descritos en el presente documento pueden ser cualquier mamífero, tales como roedores y primates, y en una realización preferida, seres humanos. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el

presente documento pueden usarse para tratar enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de enfermedad renal, ODR de recambio rápido, niveles elevados de rigidez arterial, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de niveles elevados de rigidez arterial, HVI, y/o enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de HVI; o para monitorizar y/o disminuir la calcificación vascular, la rigidez arterial (por ejemplo, vascular), la HVI, los niveles de calcio aórtico, la transición endotelial a mesenquimatosa y/o la formación ósea, y/o para aumentar la densidad mineral ósea y/o la función de las células musculares lisas vasculares, en cualquier mamífero, tales como roedores y primates, y en una realización preferida, en sujetos humanos.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene niveles elevados de activina en comparación con los niveles de activina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, los niveles de activina son los niveles de activina renal, plasmática o aórtica. En ciertas realizaciones, la activina es activina A. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene niveles aproximadamente iguales de folistatina en comparación con los niveles de folistatina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento no tiene niveles elevados de folistatina en comparación con los niveles de folistatina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento no tiene niveles reducidos de folistatina en comparación con los niveles de folistatina en comparación con los niveles de folistatina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene niveles aproximadamente iguales de 3 similar a la folistatina en comparación con los niveles de 3 similar a la folistatina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento no tiene niveles elevados de 3 similar a la folistatina en comparación con los niveles de 3 similar a la folistatina en comparación con los niveles de 3 similar a la folistatina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene niveles aproximadamente iguales de inhibina en comparación con los niveles de inhibina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento no tiene niveles elevados de inhibina en comparación con los niveles de inhibina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento no tiene niveles reducidos de inhibina en comparación con los niveles de inhibina en comparación con los niveles de inhibina en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene un nivel elevado de activina libre. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene un nivel elevado de activina libre.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento no tiene un aumento de fosfoErk 1/2 en comparación con una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el fosfoErk 1/2 es fosfoErk 1/2 aórtico.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene un aumento de la transición endotelial a mesenquimatosa (EnMT) en comparación con la EnMT en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene un aumento de la expresión de factores de transcripción asociados a EnMT, tal como, por ejemplo, Snail. En ciertas realizaciones, el aumento de EnMT en el sujeto da lugar a un aumento de la transición osteoblástica en el sujeto en comparación con la transición osteoblástica en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el aumento de EnMT en el sujeto da lugar a un aumento de la rigidez vascular en el sujeto en comparación con la rigidez vascular en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el aumento de EnMT en el sujeto da lugar a un aumento de la calcificación vascular en el sujeto en comparación con la calcificación vascular en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el aumento de EnMT en el sujeto da lugar a una disminución de la función del músculo liso vascular en el sujeto en comparación con la función del músculo liso vascular en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el aumento de EnMT en el sujeto da lugar a un aumento de la HVI en el sujeto en comparación con la HVI en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene fibrosis renal. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene glomeruloesclerosis.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, col1a1, Runx2, CTX, fosfoSmad3, proteína urinaria, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) calcificación vascular y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los

métodos descritos en el presente documento tiene (i) enfermedad cardiovascular y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular; y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) enfermedad cardiovascular asociada y/o resultante de enfermedad renal; y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) ERC-TMO y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) niveles elevados de rigidez arterial y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial; y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) HVI; y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene (i) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de HVI; y (ii) niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene niveles y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, y/o niveles y/o actividad reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, en comparación con los niveles previos de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa, respectivamente, en el sujeto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24 o 48 meses antes de la aparición de los síntomas o del diagnóstico de (i) enfermedad cardiovascular; (ii) calcificación vascular; (iii) enfermedad cardiovascular asociada a y/o derivada de calcificación vascular; (iv) enfermedad cardiovascular asociada a y/o derivada de enfermedad renal; (v) ERC-TMO; (vi) niveles elevados de rigidez arterial; (vii) HVI; (viii) enfermedad cardiovascular asociada a y/o derivada de niveles elevados de rigidez arterial; y/o (ix) enfermedad cardiovascular asociada a y/o derivada de HVI.

En ciertas otras realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas otras realizaciones, al sujeto no se le ha diagnosticado enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo. En ciertas realizaciones, la población de referencia es una población como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix son como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD y/o Sm22-alfa son como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de Snai1. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de phosphosmad2. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de phosphosmad3. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de proteína urinaria. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de col1a1. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de Runx2. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles elevados de CTX. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene

una enfermedad asociada a niveles elevados de Osterix. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles reducidos alfa-SMA. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles reducidos de MYOCD. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad asociada a niveles reducidos de Sm22-alfa.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene calcificación vascular. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular se determina como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular se determina por la puntuación de Agatston. En ciertas realizaciones, la calcificación vascular es aterosclerosis calcificada, vasculopatía medial calcificada (también conocida como esclerosis medial calcificada de Mönckeberg), calcificación medial, elastocalcinosis, arteriolopatía urémica calcificante, estenosis valvular aórtica calcificada y/o calcificación de la vena porta. En ciertas realizaciones, la enfermedad asociada a la aterosclerosis calcificada es aterosclerosis, hiperlipidemia, osteoporosis, hipertensión, inflamación, diabetes mellitus de tipo 2, enfermedad renal terminal, amputación necesaria, pseudoxantoma elástico, enfermedad renal terminal, hiperlipidemia, válvula bicúspide congénita, cardiopatía reumática y/o enfermedad hepática. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene un aumento del peso del corazón inducido por la ERC. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene hipertrofia cardíaca. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene hipertrofia miocitaria. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un aumento de la rigidez arterial y/o vascular. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene HVI.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene un nivel no deseablemente alto de calcio aórtico, calcificación vascular, niveles elevados de rigidez arterial y/o número de osteoblastos en comparación con una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento está en riesgo de desarrollar un nivel no deseablemente alto de calcio aórtico, calcificación vascular, niveles elevados de rigidez arterial y/o números de osteoblastos, tal como un sujeto con enfermedad renal crónica en comparación con una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene depósitos de calcio en ateromas aórticos en comparación con una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene niveles elevados de rigidez arterial en forma de rigidez aórtica en comparación con una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene un nivel de niveles elevados de rigidez arterial que aumenta la hipertensión en comparación con una población de referencia como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad cardiovascular asociada a una enfermedad renal y/o resulta de la enfermedad renal. En ciertas realizaciones, la enfermedad renal es enfermedad renal crónica. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene enfermedad renal crónica. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene enfermedad cardiovascular secundaria a una enfermedad renal crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad renal crónica ha alcanzado el estadio 3, estadio 4, estadio 5 o estadio 5D. En una realización específica, la enfermedad renal es una enfermedad renal terminal. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una tasa de filtración glomerular inferior a 60 ml/min/1,73m² en adultos o inferior a 89 ml/min/1,73m² en sujetos pediátricos. Véase Moe et al., 2006, Kidney International 69:1945-1953. En ciertas realizaciones, el sujeto es un adulto, en donde el sujeto tiene una tasa de filtración glomerular inferior a 50 ml/min/1,73m², 40 ml/min/1,73m², 30 ml/min/1,73m², 20 ml/min/1,73m² o inferior a 10 ml/min/1,73m². En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, en donde el sujeto pediátrico tiene una tasa de filtración glomerular inferior a 80 ml/min/1,73m², 70 ml/min/1,73m², 60 ml/min/1,73m², 50 ml/min/1,73m², 40 ml/min/1,73m², 30 ml/min/1,73m², 20 ml/min/1,73m² o inferior a 10 ml/min/1,73m². Sin quedar ligado a teoría, una tasa de filtración glomerular inferior a 60 ml/min/1,73m² en sujetos adultos e inferior a 89 ml/min/1,73m² en sujetos pediátricos da lugar a anomalías detectables en los niveles de calcio, los niveles de fósforo, los niveles de PTH y el metabolismo de la vitamina D; y los niveles anormales de estos marcadores dan lugar a enfermedades óseas. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un aclaramiento de inulina reducido en una población de referencia, tal como la población de referencia descrita en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene niveles reducidos de nitrógeno ureico en sangre una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto es hiperfosfatémico. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene fibrosis renal.

En ciertas realizaciones, el sujeto tiene síndrome de Alport. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una o más mutaciones somáticas en el gen COL4A5 asociadas al síndrome de Alport.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una patología ósea asociada con la enfermedad renal crónica, es decir, ERC-trastorno mineral óseo (ERC-TMO). Véase Moe et al., 2006, Kidney International 69:1945-1953. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una disminución del volumen de hueso trabecular en comparación con el volumen de hueso trabecular de una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto presenta una disminución

5 del grosor trabecular en comparación con el grosor trabecular de una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un aumento de la relación entre la superficie de erosión y la superficie ósea en comparación con la relación entre la superficie de erosión y la superficie ósea de una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas
10 realizaciones, el sujeto tiene un aumento de los niveles de osteoclastos en comparación con los niveles de osteoclastos de una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto ha aumentado la relación entre la superficie de osteoblastos y la superficie ósea en comparación con la relación entre la superficie de osteoblastos y la superficie ósea en una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un aumento de los
15 niveles de osteoblastos en comparación con los niveles de osteoblastos de una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una tasa de formación ósea reducida en comparación con la tasa de formación ósea de una población de referencia, tal como una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la ERC-TMO consiste en osteodistrofia renal y calcificación vascular. En ciertas realizaciones, la ERC-TMO consiste en osteodistrofia renal. En ciertas realizaciones, la
20 ERC-TMO es ERC-TMO de recambio lento. En ciertas realizaciones, la ERC-MBD consiste en niveles elevados de rigidez arterial y/o HVI. La ERC-TMO de recambio lento puede diagnosticarse mediante las características histológicas que se exponen en la Tabla 1 a continuación. Véase National Kidney Foundation, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines en el sitio web de la National Kidney Foundation. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene ODR de recambio rápido.

Tabla 1. Características histológicas de la ERC-TMO de recambio lento

Característica	Adinámica	Osteomalacia
Formación ósea		
Volumen de hueso trabecular	Normal, bajo	Variable
		Bajo, normal o alto
Volumen de osteoide	Normal, bajo	Alto-muy alto
Grosor de la costura osteoide	Normal, bajo	Alto-muy alto
Número de osteoblastos	Bajo	Bajo
Tasa de formación ósea	Baja-muy baja	Baja-muy baja
Tiempo de retardo de la mineralización	Normal	Prolongado
Resorción ósea		
Perímetro óseo erosionado	Normal, bajo	Variable
		A menudo bajo, puede ser alto
Número de osteoclastos	Bajo	Bajo, puede ser normal o alto
Fibrosis medular	Ausente	Ausente

En ciertas realizaciones, el sujeto recibe hemodiálisis.

25 En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene enfermedad renal terminal. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento recibe diálisis.

30 En ciertos ejemplos, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene un aumento de la resorción ósea en comparación con la resorción ósea en una población de referencia. En ciertos ejemplos, el aumento de la resorción ósea se determina por los niveles de CTX. En ciertos ejemplos, los niveles de CTX se determinan como se describe en la Sección 8.6. En ciertos ejemplos, la resorción ósea se evalúa como se describe en la Sección 8.6.

35 En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos aquí puede ser de cualquier edad. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 18 años. En una realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 13 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 12, menos de 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6 o menos de 5 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene 1-3 años, 3-5 años, 5-7 años, 7-9 años, 9-11 años, 11-13 años, 13-15 años, 15-20 años, 20-25 años, 25-30 años o más de 30 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene 30-35 años, 35-40 años, 40-45 años, 45-50 años, 50-55 años, 55-60 años o más de 60 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene 60-65 años, 65-70 años, 70-75 años, 75-80 años o más de 80 años.

En ciertas realizaciones, un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene enfermedad renal terminal. En ciertas realizaciones, un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento está en hemodiálisis. En ciertas realizaciones, a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina. En ciertas realizaciones, un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una enfermedad renal terminal, está en hemodiálisis y se le ha administrado previamente un agente estimulante de la eritropoyetina.

Como reconocerá un experto en la materia, los niveles y/o actividad de uno o más de Runx2, Alp, Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria pueden compararse independientemente y respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente, tal como se describe anteriormente en la Sección 8.3.1.

8.5 INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE ACTRII

Los inhibidores de la señalización de ActRII descritos en esta sección y conocidos en la técnica pueden usarse en los métodos proporcionados en el presente documento. En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII descritos en esta sección pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento (véase la Sección 8.3).

Los inhibidores de los receptores de la señalización de ActRII englobados en el presente documento incluyen inhibidores de la señalización de ActRIIA e inhibidores de la señalización de ActRIIB (véase más adelante). En ciertas realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII es específico de la señalización de ActRIIA. En otras realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII es específico de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII inhibe preferentemente la señalización de ActRIIA. En otras realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII inhibe preferentemente la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII inhibe tanto la señalización de ActRIIA como la señalización de ActRIIB.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII pueden ser polipéptidos que comprenden dominios de unión a activina de ActRII. Sin quedar ligado a teoría, dichos polipéptidos que comprenden dominios de unión a activina secuestran activina y así previenen la señalización de la activina. Estos polipéptidos que comprenden dominios de unión a activina pueden comprender toda o una porción del dominio extracelular de un ActRII (es decir, toda o una porción del dominio extracelular de ActRIIA o toda o una porción del dominio extracelular de ActRIIB). En realizaciones específicas, el dominio extracelular de un ActRII es soluble.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos que comprenden dominios de unión a activina se unen a una porción Fc de un anticuerpo (por ejemplo, se genera un conjugado que comprende un polipéptido que comprende dominios de unión a activina de un receptor ActRII y una porción Fc de un anticuerpo). Sin quedar ligado a teoría, la porción de anticuerpo confiere elevada estabilidad al conjugado. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a activina se une a una porción Fc de un anticuerpo por un conector, por ejemplo, un conector peptídico.

Los inhibidores de la señalización de ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden moléculas que inhiben la señalización de ActRIIA y/o la señalización de ActRIIB, directa o indirectamente, ya sea extracelular o intracelularmente. En algunas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIA y/o la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento inhiben la señalización de ActRIIA y/o la señalización de ActRIIB por interacciones con el (los) receptor(es) en sí. En otras realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIA y/o la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento inhiben la señalización de ActRIIA y/o la señalización de ActRIIB por interacciones con un ligando de ActRIIA y/o ActRIIB, por ejemplo, activina.

8.5.1 INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE ACTRIIA

Como se usa en el presente documento, el término "ActRIIA" se refiere a una familia de proteínas de tipo IIA de receptores de activina (ActRIIA) de cualquier especie y variante derivada de dichas proteínas ActRIIA por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIA en el presente documento se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia de ActRIIA son, en general, proteínas transmembranarias, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembranario y un dominio citoplásмico con actividad de serina/treonina cinasa predicha.

Los inhibidores de la señalización de ActRIIA que se van a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos ActRIIA solubles que se unen a activina; anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades A o B de activina, también denominadas β_A o β_B) y alteran la unión a ActRIIA; anticuerpos que se unen a ActRIIA y alteran la unión a activina; proteínas no de anticuerpo seleccionadas para unión a activina o ActRIIA (véanse, por ejemplo, los documentos de patente WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US 2003/0133939, y US 2005/0238646, para ejemplos de dichas proteínas y métodos de diseño y selección de los mismos); y péptidos aleatorizados seleccionados para unión a activina o ActRIIA, que se pueden conjugar con un dominio Fc.

En ciertas realizaciones, dos o más proteínas diferentes (u otro restos) con actividad de unión a activina o ActRIIA, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (por ejemplo, un receptor de activina de tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir juntas para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe la señalización de ActRIIA y así se puede usar en las 5 composiciones y métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, los antagonistas del eje de señalización de activina-ActRIIA que inhiben la señalización de ActRIIA incluyen aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas e incluyen otros agentes que se usan en las composiciones y métodos descritos en el presente documento.

8.5.1.1 Inhibidores de la señalización de ActRIIA que comprenden polipéptidos ActRIIA

El término "polipéptido ActRIIA" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido que exista de forma natural de un miembro de la familia de ActRIIA, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas de peptidomimético) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIA incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIA conocido que tienen una secuencia al menos 10 aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIA, y opcionalmente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIA puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIA y/o activina. Un polipéptido ActRIIB se puede seleccionar por su capacidad para promover el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIA incluyen polipéptido precursor de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos ActRIIA solubles humanos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7 y 12). Con respecto al polipéptido 15 precursor de ActRIIA cuya secuencia de aminoácidos se representa en SEQ ID NO:1, el péptido señalizador del polipéptido precursor de ActRIIA humano situado en las posiciones de aminoácidos 1 a 20; el dominio extracelular se localiza en las posiciones de aminoácidos 21 a 135 y los sitios de glucosilación unidos en N del polipéptido precursor de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 1) se localizan en las posiciones de aminoácidos 43 y 56 de SEQ ID NO:1. La secuencia del ácido nucleico 20 que codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano de SEQ ID NO:1 se desvela como SEQ ID NO:4 (nucleótidos 164-1705 de la entrada de Genbank NM_001616). La secuencia del ácido nucleico que codifica el polipéptido ActRIIA soluble humanos de SEQ ID NO:2 se desvela como SEQ ID NO:5. Véase la Tabla 21 para una descripción de las 25 secuencias.

En realizaciones específicas, los polipéptidos ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en el presente 30 documento son polipéptidos ActRIIA solubles. Un dominio extracelular de una proteína ActRIIA puede unirse a activina y, en general, es soluble, y así se puede denominar un polipéptido ActRIIA soluble de unión a activina. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "polipéptido ActRIIA soluble" se refiere, en general, a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIA, que incluye cualquier dominio extracelular que existe de forma natural de una proteína ActRIIA, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas 35 de peptidomimético). Los polipéptidos ActRIIA solubles pueden unirse a activina; sin embargo, la proteína ActRIIA natural no presenta selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. A las proteínas ActRIIA nativas o alteradas se les puede dar especificidad añadida por la activina acoplándolas con un segundo agente ligante selectivo por activina. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIA solubles de unión a activina incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 y 13. Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIA solubles de unión a activina comprenden una secuencia señal, 40 además del dominio extracelular de una proteína ActRIIA, por ejemplo, la secuencia conductora de la melitina de abeja melífera (SEQ ID NO: 8), el conductor del activador tisular del plasminógeno (TPA) (SEQ ID NO: 9) o el conductor nativo de ActRIIA (SEQ ID NO: 10). El polipéptido ActRIIA-hFc ilustrado en SEQ ID NO:13 usa un conductor de TPA.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos 45 en el presente documento comprenden un conjugado/proteína de fusión que comprende un dominio de unión a activina de ActRIIA unido a una porción Fc de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a activina se une a una porción Fc de un anticuerpo por un conector, por ejemplo, un conector peptídico. Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en restos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse al receptor de Fc con respecto a un dominio Fc no mutante. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación de Asn-434) tiene un aumento de la capacidad para unirse al receptor de Fc relacionado con la clase I del MHC (FcRN) con respecto a un dominio Fc no mutante. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo que comprenden un dominio extracelular soluble de ActRIIA fusionado con un dominio Fc se exponen en SEQ ID NO: 6, 7, 12 y 13.

En una realización específica, los inhibidores de la señalización de ActRIIA usados en las composiciones y métodos 55 descritos en el presente documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIA, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de la señalización de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, 7, 12 y 13.

En otra realización específica, los inhibidores de la señalización de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIA, o una porción del mismo, unido a una 60 porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de la señalización de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, 7, 12 y 13.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIA. La truncación puede ser en el extremo carboxi y/o el extremo amino del polipéptido ActRIIA. En ciertas realizaciones, la truncación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos de longitud con respecto al dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, la truncación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos aminoterminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIA maduro. En ciertas realizaciones, la truncación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos carboxiterminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIA maduro. Por ejemplo, las formas truncadas de ActRIIA incluyen polipéptidos con los aminoácidos 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; y 25-131, en donde las posiciones de aminoácidos se refieren a las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO:1.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden un dominio extracelular de ActRIIA con una o más sustituciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIA que también lleva una sustitución de aminoácidos.

En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIA que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIA humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIA que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIA que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano y la porción Fc de IgG1, en donde el dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano posee una o más sustituciones de aminoácidos.

Los fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIA se pueden obtener, por ejemplo, cribando polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento del ácido nucleico correspondiente que codifica un polipéptido ActRIIA. Además, los fragmentos pueden ser sintetizados químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida convencional de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o por síntesis química) y probar para identificar los fragmentos de peptidilo que pueden servir de antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIA o señalización mediada por activina.

Además, se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRIIA, por ejemplo, por cribado de bibliotecas de polipéptidos modificados recombinantemente producidos a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido ActRIIA. Las variantes se pueden producir y probar para identificar aquellas que pueden servir de antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIA o señalización mediada por activina. En ciertas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o 3. 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 SEQ ID NO: 2 o 3.

Se pueden generar variantes funcionales, por ejemplo, modificando la estructura de un polipéptido ActRIIA para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica, o estabilidad (por ejemplo, vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos ActRIIA modificados, cuando se seleccionan para retener la unión de activina, se pueden considerar equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIA que existen de forma natural. Los polipéptidos ActRIIA modificados también se pueden producir, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente (por ejemplo, mutaciones conservativas) no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIA da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIA de variante para producir una respuesta en células en un modo similar al polipéptido ActRIIA no mutante.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIA que se usará en las composiciones y métodos descritos en el presente documento proporcionados en el presente documento puede comprender un polipéptido ActRIIA que tenga una o más mutaciones específicas que puedan alterar la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones pueden introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como sitios de glucosilación unidos a O o unidos a N. Los sitios de reconocimiento de la glucosilación asociada a asparagina comprenden, en general, una secuencia de tripeptidos, asparagina-X-treonina (o asparaginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por enzimas de glucosilación celular apropiadas. La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIA no mutante (para sitios de glucosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de la glucosilación (y/o delección de aminoácidos en la

segunda posición) produce la no glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de restos de hidrato de carbono en un polipéptido ActRIIA es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con el polipéptido ActRIIA. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el (los) azúcar(es) se pueden unir 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) restos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento de patente WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La retirada de uno o más restos de hidrato de carbono presentes en un polipéptido ActRIIA se puede llevar a cabo química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIA al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe además por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en polipéptidos ActRIIA se puede lograr usando una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIA se puede ajustar, según convenga, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y vegetales pueden todas introducir patrones de glucosilación diferentes que se pueden afectar por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIA para su uso en seres humanos pueden expresarse en una estirpe celular de mamífero que proporciona la glucosilación apropiada, tales como las estirpes celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que sean útiles otros sistemas de expresión, tales como otras estirpes celulares de expresión en mamífero, estirpes celulares de levadura con enzimas de glucosilación manipuladas y células de insecto.

En el presente documento se proporcionan además métodos de generación de mutantes, particularmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIA, así como mutantes de truncación; las agrupaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El fin del cribado de dichas bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIA que pueden actuar o de agonistas o antagonista, o alternativamente, que poseen actividades novedosas en conjunto. A continuación se proporciona una variedad de ensayos de cribado, y dichos ensayos se pueden usar para evaluar variantes. Por ejemplo, se puede cribar una variante de polipéptido ActRIIA por su capacidad para unirse a un ligando de ActRIIA, para prevenir la unión de un ligando de ActRIIA a un polipéptido ActRIIA, o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIA.

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o, en general, elevada con respecto a un polipéptido ActRIIA que existe de forma natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semivididas intracelulares espectacularmente diferentes a las del polipéptido ActRIIA no mutante correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que producen la destrucción de, o inactivación de otro modo de un polipéptido ActRIIA nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIA modulando la semivida de los polipéptidos ActRIIA. Por ejemplo, una corta semivida puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptidos ActRIIA recombinantes en el sujeto. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden hacer en el conector (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria a modo de una biblioteca degenerada de genes que codifica una biblioteca de polipéptidos que incluye cada una al menos una porción de posibles secuencias de polipéptidos ActRIIA. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ser unida enzimáticamente en secuencias de genes de forma que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIA sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la presentación en fagos).

Existen muchas formas por las que la biblioteca de posibles homólogos se puede generar a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos se unen entonces en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sypos. Macromolecules, ed. AG Walton, Ámsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véanse, por ejemplo, Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las patentes de EE.UU. N.º 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar variantes de polipéptidos ActRIIA y aislar de una biblioteca por cribado usando, por ejemplo, mutagénesis por cribado de alanina y similares (Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; y

- 5 Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085), por mutagénesis por barrido de conectores (Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1986) Science 232:613); por mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); o por mutagénesis al azar, que incluye mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; y Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). La mutagénesis por barrido de conectores, particularmente en un ámbito combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIA.
- 10 Se conoce en la técnica un amplio intervalo de técnicas para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales y truncaciones, y, en este caso, para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una cierta propiedad. Dichas técnicas serán adaptables, en general, para el rápido cribado de bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIA. Las técnicas más ampliamente usadas para cribar grandes bibliotecas de genes comprenden normalmente clonar las bibliotecas de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita de forma relativamente fácil el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización de células mediada por activina.
- 15 En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden comprender además modificaciones postraduccionales, además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIA. Dichas modificaciones pueden incluir, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIA modificados pueden contener elementos no de aminoácido, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o mono-sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no de aminoácido sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIA se pueden probar por 20 cualquier método conocido por el experto. Cuando un polipéptido ActRIIA se produce en células por escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIA, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Células diferentes (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActRIIA.
- 25 En ciertos aspectos, variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIA y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humano. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos 30 dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el fin de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpressTM (Qiagen) útil con componentes de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIA. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como "marcas de epítopes," que son secuencias de péptidos normalmente cortas para las que un anticuerpo específico está disponible. Las marcas de epítopes bien conocidas para las que los anticuerpos monoclonales específicos están 35 fácilmente disponibles incluyen marcas FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de la proteasa, tales como para el factor Xa o trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y así libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas se pueden aislar entonces del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRIIA se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIA *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se indica algo que aumenta la semivida en suero, independientemente de si esto es debido a una reducción de la destrucción, una depuración reducida por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Se conoce que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio intervalo de proteínas. Asimismo, las fusiones con la albúmina de suero humano 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 función biológica adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento óseo o crecimiento muscular, según se deseé).
- 40 Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer en cualquier modo que sea coherente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIA se puede poner carboxiterminal a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo se puede poner carboxiterminal a un polipéptido ActRIIA. El dominio del polipéptido ActRIIA y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y dominios o secuencias de aminoácidos adicionales se pueden incluir carboxi- o aminoterminales a cualquier dominio o entre los dominios.
- 45 En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en el presente documento contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIA. Por 50
- 55
- 55 En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en el presente documento contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIA. Por

ejemplo, dichas modificaciones pueden potenciar la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRIIA, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIA o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIA. Dichas modificaciones estabilizantes pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIA y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRIIA) y modificaciones del resto de hidrato de carbono (incluyendo, por ejemplo, retirada de restos de hidrato de carbono de un polipéptido ActRIIA). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIA se fusiona con un dominio estabilizador, tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc), como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas, tales como un resto de hidrato de carbono, o polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIA, que se aíslan de, o están de otro modo sustancialmente libres de, otras proteínas se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Los polipéptidos ActRIIA pueden producirse, en general, por expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se generan usando ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIA (por ejemplo, polipéptidos ActRIIA solubles), que incluyen fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión desveladas en el presente documento. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIA humano que existen de forma natural, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular de ActRIIA procesado. Dichos ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos de preparación de polipéptidos ActRIIA o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIA pueden incluir ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 4 o 5. Las secuencias de nucleótidos de variante incluyen secuencias que se diferencian en una o más sustituciones, adiciones o delecciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En ciertas realizaciones, las secuencias del ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican polipéptidos ActRIIA pueden ser al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID NO: 4 o 5. Un experto habitual en la técnica apreciará que las secuencias del ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO: 4 o 5, y variantes de SEQ ID NO: 4 o 5 pueden usarse en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En otras realizaciones, dichas secuencias del ácido nucleico pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o ser de una biblioteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos usados en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente estrictas con la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 4 o 5, secuencia del complemento de SEQ ID NO: 4 o 5, o fragmentos de las mismas. Un experto habitual en la técnica entenderá que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación en 6,0 veces cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, seguido de un lavado de 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius. Por ejemplo, la concentración de sales en la etapa de lavado se puede seleccionar de una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 veces SSC a 50 grados Celsius. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 grado Celsius, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 grados Celsius. Se pueden variar tanto la temperatura como la sal, o se puede mantener constante la temperatura o concentración de sales mientras se cambia la otra variable. En una realización, los ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 veces SSC a temperatura ambiente seguido por un lavado a 2 veces SSC a temperatura ambiente se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Los ácidos nucleicos aislados que se diferencian de los ácidos nucleicos como se exponen en SEQ ID NO: 4 o 5 debido a la degeneración en el código genético también pueden usarse en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto existan entre las células de mamífero. 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.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán, en general, 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 una variedad de células hospedadoras.

- Normalmente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias conductoras o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias traduccionales de inicio y terminación y secuencias potenciadoras o activadoras. Se contemplan en el presente documento promotores constitutivos o inducibles como se conoce en la técnica. Los promotores pueden ser o promotores que existen de forma 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. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de marcadores de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.
- En ciertos aspectos, el ácido nucleico usado en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIA y está operativamente unida a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIA. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Las secuencias reguladoras a modo de ejemplo se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se une operativamente en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIA. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40, promotor tet, promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, promotores del VSR, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador mayor y regiones promotoras de fago lambda, las regiones de control para la proteína de la envoltura fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de la levadura, el promotor poliédrico del sistema de 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 hospedadora a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debería 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 marcadores de antibiótico.
- Se puede producir un ácido nucleico recombinante usado en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento uniendo el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en cualquier célula procariota, célula eucariota (levadura, aviar, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIA recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.
- 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 eucariota que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pknneo 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 resistencia a la selección de fármacos en tanto células procariotas como eucariotas. Alternativamente, derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (VPB-1) o virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) se pueden usar para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluyendo retrovíricos) se pueden encontrar en la siguiente descripción de sistemas de administración de genoterapia. Se conocen bien en la técnica diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores. Para otros sistemas de expresión adecuados para tanto células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3^a ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, se puede desear expresar los polipéptidos recombinantes usando un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene .beta.-gal).
- Se pueden diseñar vectores para la producción de los polipéptidos ActRIIA objeto en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores de pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores de pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como será evidente, las construcciones génicas objeto se pueden usar para causar la expresión de polipéptidos ActRIIA objeto en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, que incluyen proteínas de fusión o proteínas de variante, para la purificación.
- Se pueden usar células hospedadoras transfectadas con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 o 5) para uno o más de los polipéptidos ActRIIA objeto en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. La célula hospedadora

puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIA proporcionado en el presente documento se puede expresar en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la técnica conocen otras células hospedadoras adecuadas.

5 Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos de producción de los polipéptidos ActRIIA. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIA se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido ActRIIA. El polipéptido ActRIIA se puede secretar y aislar de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIA. Alternativamente, el polipéptido ActRIIA puede ser retenido citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células se recogen, lisán y se aísle la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Se conocen bien en la técnica medios adecuados para el cultivo celular. Los polipéptidos ActRIIA objeto se pueden aislar del medio de cultivo celular, células hospedadoras, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, inmunopurificación 10 por afinidad con anticuerpos específicos contra epítopes particulares de los polipéptidos ActRIIA y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido ActRIIA (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIA-Fc). En una realización preferida, el polipéptido ActRIIA es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización, la purificación se logra por una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: 15 cromatografía en proteína A, cromatografía en QSepharose, cromatografía en Phenyl Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría ser completada con filtración vírica e intercambio de tampón. Como se demuestra en el presente documento, se purificó la proteína ActRIIA-hFc hasta una pureza de >98% como se ha determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% como se ha determinado por SDS-PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de 20 seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

25 En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia conductora de la purificación, tal como una secuencia del sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo N de la porción deseada de un polipéptido ActRIIA recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni²⁺. La secuencia conductora de la purificación se puede retirar entonces posteriormente mediante 30 tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIA purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

35 Se conocen bien las técnicas de preparación de genes de fusión. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o de terminación escalonada para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según convenga, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión no deseable y unión enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se 40 puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a nucleótidos protuberantes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden posteriormente ser hibridados para generar una secuencia de genes químéricos (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

45 La proteína de fusión ActRIIA-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX BI 1 establemente transfectadas de un vector pAID4 (ori/potenciador del SV40, promotor del CMV), usando una secuencia conductora de plasminógeno tisular de SEQ ID NO:9. La porción Fc es una secuencia de Fc de IgG1 humana, como se muestra en SEQ ID NO:7. En ciertas realizaciones, tras la expresión, la proteína contenida tiene, en promedio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIA-Fc.

50 En ciertas realizaciones, la larga semivida en suero de una fusión ActRIIA-Fc puede ser 25-32 días en sujetos humanos. Además, el material expresado en células CHO puede tener una mayor afinidad por el ligando de activina B que el informado para una proteína de fusión ActRIIA-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., J Biol Chem. dic 2004 17;279(51):53126-35). Además, sin quedar ligado a teoría, el uso de la secuencia conductora de TPA proporcionó mayor producción que otras secuencias conductoras y, a diferencia de ActRIIA-Fc expresada con un conductor nativo, 55 puede proporcionar una secuencia aminoterminal altamente pura. El uso de la secuencia conductora nativa puede producir dos especies importantes de ActRIIA-Fc, cada una de las cuales tiene una secuencia aminoterminal diferente.

8.5.2 INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE ACTRIIB

60 Como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas de tipo IIB del receptor de activina (ActRIIB) de cualquier especie y variante derivada de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación. Referencia a ActRIIB en el presente documento se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas del receptor. Miembros de la familia ActRIIB son, en general, proteínas transmembranarias, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio 65 transmembranario y un dominio citoplásmico con actividad de serina/treonina cinasa predicha.

Los inhibidores de la señalización de ActRIIB que van a usarse en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos ActRIIB solubles que se unen a activina; anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades A o B de activina, también denominadas β_A o β_B) y alteran la unión de ActRIIB; anticuerpos que se unen a ActRIIB y alteran la unión a activina; proteínas no de anticuerpo seleccionadas para la unión a activina o ActRIIB; y péptidos aleatorizados seleccionados para la unión a activina o ActRIIB, que se pueden conjugar con un dominio Fc.

En ciertas realizaciones, dos o más proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión de activina o ActRIIB, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (por ejemplo, un receptor de activina de tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir juntas para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe ActRIIB y así se puede usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, los agonistas del eje de señalización de activina-ActRIIB que inhiben ActRIIB incluyen aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas e incluyen otros agentes que se usan en las composiciones y métodos descritos en el presente documento.

15 8.5.2.1 Inhibidores de la señalización de ActRIIB que comprenden polipéptidos ActRIIB

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido ActRIIB" se refiere a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido que existe de forma natural de un miembro de la familia de ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas de peptidomimético) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier receptor ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y opcionalmente al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o activina. Un ejemplo de un polipéptido ActRIIB incluye el polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28. Con respecto al polipéptido precursor de ActRIIB cuya secuencia de aminoácidos se representa como SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 (es decir, el polipéptido precursor de ActRIIB humano), el péptido señalizador del polipéptido precursor de ActRIIB se sitúa en los aminoácidos 1 a 18; el dominio extracelular se sitúa en los aminoácidos 19 a 134 y los posibles sitios de glucosilación unidos a N se sitúan en las posiciones de aminoácidos 42 y 65. La secuencia del ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano de SEQ ID NO: 16 se desvela como SEQ ID NO:19 (SEQ ID NO:19 proporciona una alanina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64, pero en su lugar podría ser fácilmente modificado por un experto en la técnica usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar una arginina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64). Véase la Tabla 21 para una descripción de las secuencias.

35 La numeración de aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en el presente documento se basa en la numeración de aminoácidos para SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO:28 (que solo difieren en el aminoácido expresado en la posición 64), a menos que se designe específicamente lo contrario. Por ejemplo, si se describe un polipéptido ActRIIB que tiene una sustitución/mutación en la posición de aminoácido 79, entonces se debe entender que la posición 79 se refiere al 79.^º aminoácido en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28, del que deriva el polipéptido ActRIIB. 40 Asimismo, si se describe que un polipéptido ActRIIB tiene una alanina o una arginina en la posición de aminoácido 64, entonces se debe entender que posición 64 se refiere al aminoácido 64.^º en SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28, del que deriva el polipéptido ActRIIB.

45 En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden polipéptidos que comprenden un dominio de unión a activina de ActRIIB. En algunas realizaciones, los dominios de unión a activina de ActRIIB comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo. En realizaciones específicas, el dominio extracelular o porción del mismo de ActRIIB es soluble. Formas modificadas ilustrativas de polipéptidos ActRIIB se desvelan en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.^º 20090005308 y 20100068215.

50 En realizaciones específicas, los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento son polipéptidos ActRIIB solubles. El término "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere, en general, a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB, que incluye cualquier dominio extracelular que existe de forma natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas de peptidomimético). Los polipéptidos ActRIIB solubles se pueden unir a activina; sin embargo, la proteína ActRIIB natural no presenta selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. En ciertas realizaciones, formas alteradas de ActRIIB con diferentes propiedades de unión se pueden usar en los métodos proporcionados en el presente documento. Dichas formas alteradas se desvelan en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.^º WO 2006/012627 y WO 2010/019261. A las proteínas ActRIIB nativas o alteradas se les puede dar especificidad adicional por activina acoplándolas a un segundo agente de unión selectivo por activina. Los polipéptidos ActRIIB solubles a modo de ejemplo incluyen el dominio extracelular de un polipéptido ActRIIB humano (por ejemplo, SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43).

65 Se ha demostrado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia extracelular ActRIIB desvelada por Hilden et al. (Blood, 1994, 83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 16 (denominada en el presente documento "A64") posee una

afinidad relativamente baja por la activina y GDF-11. Por el contrario, una proteína de fusión de Fc con una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB (denominada en el presente documento "R64") tiene una afinidad por activina y GDF-11 en el intervalo de nanomolar bajo a picomolar alto (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20100068215). Una secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB con una arginina en la posición 64 se presenta en SEQ ID NO:28. Como tal, en ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden comprender o (i) una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 16; o (ii) una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 28. En otras realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden comprender un aminoácido que no es alanina ni arginina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28.

Se ha mostrado que una delección del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor por activina (véase, por ejemplo, Attisano et al., Cell, 1992, 68(1):97-108). Una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO: 28 (es decir, SEQ ID NO:32), "ActRIIB(20-119)-Fc", tiene unión reducida a GDF-11 y activina con respecto a una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO: 28 (es decir, SEQ ID NO:31), "ActRIIB(20-134)-Fc", que incluye la región del nudo de prolina y el dominio yuxtamembranario completo. Sin embargo, una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-129 de SEQ ID NO: 28, "ActRIIB(20-129)-Fc", retiene actividad similar, pero algo reducida, con respecto al dominio extracelular no truncado de ActRIIB, aún cuando la región de nudo de prolina se altere. Por lo tanto, se espera que todos los polipéptidos ActRIIB que comprenden dominios extracelulares que paran en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 de SEQ ID NO: 28 (o SEQ ID NO:16) sean activos, pero las construcciones que paran en el aminoácido 134 o 133 pueden ser más activas. Similarmente, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los restos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando en grandes márgenes, como se indica por el hecho de que las mutaciones de P129 y P130 de SEQ ID NO: 28 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB usados según los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (es decir, la cisteína final) de SEQ ID NO:28 (o SEQ ID NO:16); sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre las posiciones de aminoácidos 109 y 119 de SEQ ID NO:28 (o SEQ ID NO:16) tenga capacidad de unión al ligando reducida.

El aminoácido 29 de SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:28 representa la cisteína inicial en la secuencia precursora de ActRIIB. Se espera que un polipéptido ActRIIB que empieza en el aminoácido 29 del extremo N de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28, o antes de estas posiciones de aminoácidos, retenga la actividad de unión al ligando. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 introduce una secuencia de glucosilación unida a N sin afectar sustancialmente la unión al ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señal y la región de reticulación de cisteína, correspondientes a los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28, son bien tolerados. En particular, los polipéptidos ActRIIB que empiezan en la posición de aminoácido 20, 21, 22, 23 y 24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 retendrán actividad, y los polipéptidos ActRIIB que empiezan en las posiciones de aminoácidos 25, 26, 27, 28 y 29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 también se espera que retengan actividad. Un polipéptido ActRIIB que empieza en la posición de aminoácido 22, 23, 24 o 25 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 tendrá la mayor actividad.

Tomados conjuntamente, las porciones activas (es decir, los polipéptidos ActRIIB) de la proteína precursora ActRIIB (es decir, SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28) que se van a usar según los métodos y composiciones descritos en el presente documento comprenderán, en general, los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28, y dichos polipéptidos ActRIIB pueden empezar, por ejemplo, en un resto correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 19-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y terminar en una posición correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. Los ejemplos específicos de polipéptidos ActRIIB englobados en el presente documento incluyen los que empiezan en una posición de aminoácido desde 19-29, 20-29 o 21-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y terminan en una posición de aminoácido desde 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. Otros ejemplos específicos de polipéptidos ActRIIB englobados en el presente documento incluyen los que empiezan en una posición de aminoácido desde 20-24 (o 21-24, o 22-25) de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y terminan en una posición de aminoácido desde 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. También se contemplan los polipéptidos ActRIIB de variante que se encuentran dentro de estos intervalos, particularmente los que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia u homología de secuencias con la porción correspondiente de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB. La truncación puede ser en el extremo carboxi y/o el extremo amino del polipéptido ActRIIB. En ciertas realizaciones, la truncación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos de longitud con respecto al dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, la truncación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos aminoterminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, la truncación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos carboxiterminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. Por ejemplo, las formas truncadas de ActRIIB incluyen polipéptidos con los aminoácidos 20-

119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; y 25-131, en donde las posiciones de aminoácidos se refieren a las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28.

5 Formas truncadas adicionales a modo de ejemplo de ActRIIB incluyen (i) polipéptidos que empiezan en los aminoácidos en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 (opcionalmente que empiezan en 22-25 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28) y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (ii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 (opcionalmente que empiezan en 22-25 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28) y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (iii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 (opcionalmente que empiezan en 22-25 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28) y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (iv) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (v) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ
10 ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (vi) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (vii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (viii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (ix) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (x) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; (xi) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28; y (xii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. En una realización específica, un polipéptido ActRIIB comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que empieza en la posición de aminoácido 25 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 y que termina en la posición de aminoácido 131 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. En otra realización específica, 15 un polipéptido ActRIIB consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, 18, 23, 20 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, o 43.

35 Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede producirse como un homodímero. Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se puede formular como una proteína de fusión que tiene una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28.

40 En realizaciones específicas, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden un dominio extracelular de ActRIIB con una o más sustituciones/mutaciones de aminoácidos. Dicha sustitución/mutación de aminoácido puede ser, por ejemplo, un intercambio de la leucina en la posición de aminoácido 79 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 a un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. Por ejemplo, la posición L79 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 se puede alterar en los polipéptidos del dominio extracelular de ActRIIB para conferir propiedades de unión alteradas a activina-miostatina (GDF-11). Las mutaciones L79A y L79P reducen la unión a GDF-11 a un grado mayor que la unión a activina. Las mutaciones L79E y L79D retienen la unión a GDF-11, mientras que se demuestra una unión a activina enormemente reducida.

45 En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden comprender una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB que también lleva una sustitución de aminoácidos, por ejemplo, un intercambio de la leucina en la posición de aminoácido 79 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 a un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. En una realización específica, la forma truncada de un dominio extracelular de polipéptido ActRIIB que también lleva una sustitución de aminoácidos usada en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es SEQ ID NO:23. Las formas de ActRIIB que están truncadas y/o llevan una o más sustituciones de aminoácidos se pueden unir a un dominio Fc de un anticuerpo como se trata anteriormente.

50 Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, por cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB. Además, los fragmentos pueden ser sintetizados químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida convencional de Merrifield. Como reconocerá un experto en la materia, 55 pueden usarse otras técnicas, incluyendo por ejemplo diversas resinas y sistemas en fase en disolución, para la síntesis de péptidos, para sintetizar los fragmentos de peptidilo descritos en el presente documento. Los fragmentos se pueden

producir (recombinantemente o por síntesis química) y probar para identificar los fragmentos de peptidilo que pueden servir de antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o señalización mediada por activina.

Además, se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, cribando bibliotecas de polipéptidos modificados recombinantemente producidos a partir de los ácidos nucleicos correspondientes mutagenizados que codifican un polipéptido ActRIIB. Las variantes se pueden producir y probar para identificar aquellas que pueden servir de antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o señalización mediada por activina. En ciertas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43. En ciertas realizaciones, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43.

Se pueden generar variantes funcionales, por ejemplo, modificando la estructura de un polipéptido ActRIIB para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica, o estabilidad (por ejemplo, vida útil *ex vivo* y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos ActRIIB modificados, cuando se seleccionan para retener la unión a activina, son considerados equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIB que existen de forma natural. Los polipéptidos ActRIIB modificados también se pueden producir, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente (por ejemplo, mutaciones conservativas) no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIB de variante para producir una respuesta en células en un modo similar al polipéptido ActRIIB no mutante.

Los mutantes del polipéptido ActRIIB, en particular conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIB, así como mutantes de truncamiento; los conjuntos de mutantes combinatorios que son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. El fin de cribar dichas bibliotecas combinatorias puede ser para generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIB que pueden servir o de agonistas o antagonistas, o alternativamente, poseer actividades novedosas en conjunto.

Se ha demostrado que el sitio de unión al ligando de ActRIIB se define por los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y F101 de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28. En estas posiciones, se espera que las mutaciones conservativas sean toleradas, aunque una mutación K74A es bien tolerada, ya que son R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es K en *Xenopus*, que indica que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus*, y por lo tanto los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para un polipéptido ActRIIB para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una que comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28, pero opcionalmente que empiezan en una posición de aminoácido que varía desde 20-24 o 22-25 de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28 y que terminan en una posición de aminoácido que varía desde 129-134 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28, y que comprende no más de 1, 2, 5 o 15 cambios conservativos de aminoácidos en el sitio de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones de aminoácidos 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 en el sitio de unión a ligando. Dicho polipéptido ActRIIB puede retener más de 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia u homología de secuencias con la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:28. Los sitios fuera del sitio de unión, en los que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular de ActRIIB, y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 (N65A) mejora en realidad la unión a ligando en el acervo de A64, y así se espera que no tenga efecto perjudicial sobre la unión a ligando en el acervo de R64. Este cambio elimina probablemente la glucosilación en N65 en el acervo de A64, demostrándose así que es probable que sea tolerado un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio de R64A es mal tolerado, R64K es bien tolerado, y así otro resto básico, tal como H, puede ser tolerado en la posición 64.

Como un ejemplo específico de un polipéptido ActRIIB con una mutación en el dominio de unión a ligando, el resto de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB se puede mutar a un resto de aminoácido diferente de forma que el polipéptido ActRIIB de variante se una preferentemente a GDF8, pero no a activina. En una realización específica, el resto D80 se cambia a un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un resto de aminoácido sin carga, un resto de aminoácido negativo y un resto de aminoácido hidrófobo. Como un ejemplo específico adicional, el resto hidrófobo L79 se puede alterar a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir enormemente la unión a activina, mientras que se retiene la unión a GDF11. Como reconocerá un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas se pueden hacer al nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, por modificación postraduccional o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. En realizaciones específicas, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden un conjugado/proteína de fusión que comprende un dominio extracelular

(por ejemplo, un dominio de unión a activina) de un receptor de ActRIIB unido a una porción Fc de un anticuerpo. Dicho conjugado/proteínas de fusión puede comprender cualquiera de los polipéptidos ActRIIB desvelados en el presente documento (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NOS:17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, o 43), cualquier polipéptido ActRIIB conocido en la técnica, o cualquier polipéptido ActRIIB generado usando métodos conocidos en la técnica y/o proporcionados en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el dominio extracelular se une a una porción Fc de un anticuerpo por un conector, por ejemplo, un conector peptídico. Los conectores a modo de ejemplo incluyen secuencias de polipéptidos cortas, tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 restos de aminoácidos (por ejemplo, restos de glicina), tales como, por ejemplo, un conector Gly-Gly-Gly. En una realización específica, el conector comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly (GGG). En otra realización específica, el conector comprende la secuencia de aminoácidos Thr-Gly-Gly-Gly (TGGG). Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en restos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse al receptor de Fcγ con respecto a un dominio Fc no mutante. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación de Asn-434) tiene un aumento de la capacidad para unirse al receptor de Fcγ relacionado con la clase I del MHC (FcRN) con respecto a un dominio Fc no mutante. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo que comprenden un dominio extracelular soluble de ActRIIB fusionado con un dominio Fc se exponen en SEQ ID NOs:20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46, y 47.

En una realización específica, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de la señalización de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46, y 47. En otra realización específica, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de la señalización de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS:20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46, y 47.

En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor de ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en donde el dominio extracelular truncado del receptor de ActRIIB humano posee una sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 79 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. En una realización, la sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 79 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 es una sustitución de leucina por ácido aspártico (es decir, una mutación L79D).

En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es SEQ ID NO:24 o 25, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor de ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en donde dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:28 con una mutación L79D. La secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ActRIIB-Fc de SEQ ID NO:24 se presenta en SEQ ID NO:45.

En otra realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es SEQ ID NO:34 o 35, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor de ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en donde dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:16 con una mutación L79D.

Los sitios de reconocimiento de la glucosilación unidos a asparagina comprenden, en general, una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por enzimas de glucosilación celular apropiadas. La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más de restos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB no mutante (para sitios de glucosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de la glucosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) produce la no glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de restos de hidrato de carbono en un polipéptido ActRIIB es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con el polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el (los) azúcar(es) se pueden unir 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) restos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en la solicitud de patente internacional N.º WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La retirada de uno o más restos de hidrato de carbono presentes en un polipéptido ActRIIB se puede llevar a cabo química y/o

- enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe además por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en polipéptidos ActRIIB se puede lograr usando una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIB se puede ajustar, según convenga, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y vegetales pueden todas introducir diferentes patrones de glucosilación que se pueden afectar por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para su uso en seres humanos se expresarán en una estirpe celular de mamífero que proporciona la glucosilación apropiada, tales como las estirpes celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que sean útiles otros sistemas de expresión, tales como otras estirpes celulares de expresión en mamífero, estirpes celulares de levadura con enzimas de glucosilación manipuladas y células de insecto.
- En realizaciones específicas, polipéptidos ActRIIB mutados que comprenden la adición de un sitio de glucosilación unido a N adicional (N-X-S/T) que aumenta la semivida en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, con respecto a la forma ActRIIB(R64)-Fc, pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En una realización específica, la introducción de una asparagina en la posición 24 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28 (A24N) produce la creación de una secuencia NXT que confiere una semivida más larga. Otras secuencias NX(T/S) se pueden encontrar en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque la última puede no estar eficientemente glucosilada con R en la posición 64 (es decir, en polipéptidos R64). Las secuencias N-X-S/T pueden ser introducidas, en general, en las posiciones fuera del sitio de unión al ligando de ActRIIB, que se detalla anteriormente. 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 de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el conector entre la secuencia ActRIIB y el componente de fusión Fc u otro. Dicho sitio se puede introducir con esfuerzo mínimo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o introduciendo un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por lo tanto, alteraciones deseables que crearían un sitio de glucosilación unido al N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinadas con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T (pudiéndose encontrar todas las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:28). Cualquier S que se prediga que está glucosilado se puede alterar a un T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección proporcionada por la glucosilación. Asimismo, cualquier T que se prediga que está glucosilado se puede alterar a un S. Así, las alteraciones S67T y S44T están englobadas en el presente documento. Asimismo, en una variante de A24N, se puede usar una alteración de S26T. Por consiguiente, un polipéptido ActRIIB puede incluir una o más secuencias consenso de glucosilación unidas a N no endógenas adicionales.
- Se puede usar una variedad de ensayos de cribado para evaluar las variantes de polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, se puede cribar una variante de polipéptido ActRIIB para la capacidad para unirse a un ligando de ActRIIB, para prevenir la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB, o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIB. La actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes también se pueden probar en un ensayo basado en células o *in vivo*.
- Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o, en general, elevada con respecto a un polipéptido ActRIIB que existe de forma natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semivididas intracelulares espectacularmente diferentes a las del polipéptido ActRIIB no mutante correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que producen la destrucción de, o inactivación de otro modo de un polipéptido ActRIIB nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIB modulando la semivida de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una corta semivida puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptidos ActRIIB recombinante en el sujeto. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden hacer en el conector (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.
- Se puede producir una biblioteca combinatoria a modo de una biblioteca de genes degenerada que codifica una biblioteca de polipéptidos que incluye cada una al menos una porción de posibles secuencias de polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ser unida enzimáticamente en secuencias de genes de forma que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIB sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación en fagos).
- Existen muchas formas por las que la biblioteca de posibles homólogos se puede generar a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos se unen entonces en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Ámsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras

proteínas (véanse, por ejemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; así como las patentes de EE. UU. N.º 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

- 5 Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar variantes de polipéptidos ActRIIB y aislar de una biblioteca por cribado usando, por ejemplo, mutagénesis por cribado de alanina y similares (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; y Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), por mutagénesis por barrido de conectores (Gustin et al., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) *Science* 232:316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); por mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o por mutagénesis al azar, que incluye mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; y Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). Las mutagénesis por barrido de conectores, particularmente en un ámbito combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIB.

Se conoce en la técnica un amplio intervalo de técnicas para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales y truncaciones, y, en este caso, para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una cierta propiedad. Dichas técnicas serán adaptables, en general, para el rápido cribado de bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIB. Las técnicas más ampliamente usadas para cribar grandes bibliotecas de genes comprenden normalmente clonar las bibliotecas de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita de forma relativamente fácil el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización de células mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden comprender además modificaciones postraduccionales, además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos no de aminoácido, tales como polielenglicos, lípidos, poli- o mono-sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no de aminoácido sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB se pueden probar por cualquier método conocido por el experto. Cuando un polipéptido ActRIIB se produce en células por escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Células diferentes (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActRIIB.

40 En ciertos aspectos, variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humano. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el fin de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpressTM (Qiagen) útil con componentes de fusión (HIS6). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIB. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como "marcas de epítopes," que son secuencias de péptidos normalmente cortas para las que un anticuerpo específico está disponible. Las marcas de epítopes bien conocidas para las que los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen marcas FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de la proteasa, tales como para el factor Xa o trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y así libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas se pueden aislar entonces del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se indica algo que aumenta la semivida en suero, independientemente de si esto es debido a una reducción de la destrucción, una depuración reducida por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Se conoce que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio intervalo de proteínas. Asimismo, las fusiones con la albúmina de suero humano 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 función biológica adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento óseo o crecimiento muscular, según se desee).

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer en cualquier modo que sea coherente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede poner carboxiterminal a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo se puede poner carboxiterminal a un polipéptido ActRIIB. El dominio del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y dominios o secuencias de aminoácidos adicionales se pueden incluir carboxi- o aminoterminales a cualquier dominio o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRIIB, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Dichas 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 estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRIIB) y modificaciones del resto de hidrato de carbono (incluyendo, por ejemplo, retirada de restos de hidrato de carbono de un polipéptido ActRIIB). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio estabilizador, tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc), como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas, tales como un resto de hidrato de carbono, o polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en el presente documento usan polipéptidos ActRIIB aislados o purificados, es decir, polipéptidos ActRIIB que se aíslan de, o están de otro modo sustancialmente libres de, otras proteínas se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Los polipéptidos ActRIIB se producirán, en general, por expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento están codificados por ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes, que incluyen fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión desveladas en el presente documento. Por ejemplo, SEQ ID NO: 19 codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano que existen de forma natural. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos de preparación de polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos que pueden usarse para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 19, además de todas las variantes de aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43). Las secuencias de nucleótidos de variante incluyen secuencias que se diferencian en una o más sustituciones, adiciones o delecciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En ciertas realizaciones, las secuencias del ácido nucleico aisladas o recombinantes que pueden usarse para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43). Un experto habitual en la técnica apreciará que las secuencias del ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43), y variantes de SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43) se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En otras realizaciones, las secuencias del ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente estrictas con la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43), secuencia complementaria de SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43), o fragmentos de los mismos. Un experto habitual en la técnica entenderá que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación en 6,0 veces cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, seguido de un lavado de 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius. Por ejemplo, la concentración de sales en la etapa de lavado se puede seleccionar de una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 veces SSC a 50 grados Celsius. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente,

aproximadamente 22 grado Celsius, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 grados Celsius. Se pueden variar tanto la temperatura como la sal, o se puede mantener constante la temperatura o concentración de sales mientras se cambia la otra variable. En una realización, los ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 veces SSC a temperatura ambiente seguido por un lavado a 2 veces SSC a temperatura ambiente se 5 pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos que se exponen en SEQ ID NO:19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43) debido a degeneración en el código genético también 10 se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los 15 polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto existan entre las células de mamífero. 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. Todas y cada una de dichas variaciones 20 de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes que pueden usarse para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladores en una construcción de expresión. Las secuencias 25 de nucleótidos reguladoras serán, en general, 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 una variedad de células hospedadoras. Normalmente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias conductoras o señal, sitios de unión al ribosoma, 30 secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias traduccionales de inicio y terminación y secuencias potenciadoras o activadoras. En el presente documento se pueden usar promotores constitutivos o inducibles como se conoce en la técnica con los métodos y composiciones descritos. Los promotores pueden ser o promotores que existen de forma natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión 35 puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión se puede insertar en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de marcadores de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que se puedan usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento se proporcionan en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y está unida operativamente a al menos una 40 secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIB. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Las secuencias reguladoras a modo de ejemplo se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia 45 de ADN cuando se une operativamente en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40, promotor tet, promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, promotores del VSR, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador mayor y regiones promotoras de fago lambda, las regiones de control para la proteína de la envoltura fd, el promotor para 50 la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de la levadura, el promotor poliédrico del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas 55 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 hospedadora a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debería 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 marcadores de antibiótico.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante uniendo el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector 60 adecuado para la expresión en cualquier célula procariota, célula eucariota (levadura, aviar, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

65 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 eucariota que se expresan en células eucariotas. Los vectores

5 derivados de pcDNAVamp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHg y 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 resistencia a la selección de fármacos en tanto células procariotas como eucariotas. Alternativamente, 10 derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (VPB-1) o virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) se pueden usar para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluyendo retrovíricos) se pueden encontrar en la siguiente descripción de sistemas de administración de genoterapia. Se conocen bien en la técnica diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores. Para otros sistemas de expresión adecuados para tanto células procariotas 15 como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3^a ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, se puede desear expresar los polipéptidos recombinantes usando un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene .beta.-gal).

20 En una realización, se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores de pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores de pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como será evidente, las construcciones génicas objeto se pueden usar para causar la expresión de polipéptidos ActRIIB objeto en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, que incluyen proteínas de fusión o proteínas de variante, para la purificación.

25 30 Se puede usar células hospedadoras transfectadas con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43)) para uno o más de los polipéptidos ActRIIB objeto para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede expresar en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la técnica conocen otras células hospedadoras adecuadas.

35 40 45 Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos de producción de los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido 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 puede ser retenido citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células se recogen, lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Se conocen bien en la técnica medios adecuados para el cultivo celular. Los polipéptidos ActRIIB objeto se pueden aislar del medio de cultivo celular, células hospedadoras, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, inmunopurificación por afinidad con anticuerpos específicos contra epítopes particulares de los polipéptidos ActRIIB y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido ActRIIB (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIB-Fc). En una realización preferida, el polipéptido ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferida, la purificación se logra por una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en Q-Sepharose, cromatografía en Phenyl Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría ser completada con filtración vírica e intercambio de tampón. Como se demuestra en el presente documento, se purificó la proteína ActRIIB-hFc hasta una pureza de >98% como se ha determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% como se ha determinado por SDS-PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

55 60 En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia conductora de la purificación, tal como una secuencia del sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo N de la porción deseada del polipéptido ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni²⁺. La secuencia conductora de la purificación se pueden retirar entonces posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIB purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

65 Se conocen bien las técnicas de preparación de genes de fusión. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o de terminación escalonada para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según convenga, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión no deseable y unión enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales que

incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a nucleótidos protuberantes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden posteriormente ser hibridados para generar una secuencia de genes químéricos (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

5 La proteína de fusión ActRIIB-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX BI 1 establemente transfectadas de un vector pAID4 (ori/potenciador del SV40, promotor del CMV), usando una secuencia conductora de plasminógeno tisular de SEQ ID NO:8. La porción Fc puede comprender una secuencia de Fc de IgG1 humana, como se muestra en SEQ ID NO:7. En ciertas realizaciones, tras la expresión, la proteína contenida tiene, en promedio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIB-Fc.

10 En ciertas realizaciones, la larga semivida en suero de una fusión ActRIIB-Fc puede ser 25-32 días en sujetos humanos. Además, el material expresado en células CHO puede tener una mayor afinidad por el ligando de activina B que el informado para una proteína de fusión ActRIIB-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., J Biol Chem. 2004 15 Dec 17;279(51):53126-35). Además, sin quedar ligado a teoría, el uso de la secuencia conductora de TPA proporcionó mayor producción que otras secuencias conductoras y, a diferencia de ActRIIB-Fc expresada con un conductor nativo, puede proporcionar una secuencia aminoterminal altamente pura. El uso de la secuencia conductora nativa puede producir dos especies importantes de ActRIIB-Fc, cada una de las cuales tiene una secuencia aminoterminal diferente.

20 8.5.3 OTROS INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES ACTRII

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento son compuestos de ácido nucleico.

25 Ejemplos de categorías de compuestos de ácido nucleico que inhiben los receptores ActRII incluyen ácidos nucleicos antisentido, construcciones de ARNip o iARN y construcciones catalíticas de ácidos nucleicos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser mono- o bicatenario. Un compuesto bicatenario también puede incluir regiones de nucleótidos protuberantes o de no complementariedad, donde una o la otra de las cadenas es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, que significa que el compuesto puede formar una 30 denominada estructura de "horquilla" o "tallo-bucle", con una región de estructura helicoidal doble.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos de ácido nucleico que inhiben los receptores ActRII pueden comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región que consiste en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 30, 25, 22, 20 o 18 nucleótidos de la secuencia del ácido nucleico de receptor ActRII de longitud completa o secuencia del ácido nucleico de activina (por ejemplo, la secuencia del ácido nucleico de una subunidad de activina A o activina B, también denominada β_A o β_B). En realizaciones específicas, la región de complementariedad será al menos de 8 nucleótidos, y opcionalmente al menos de 10 o al menos 15 nucleótidos, y opcionalmente entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede entrar dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no codificante del transcripto diana, tal como la porción de la secuencia codificante. 40 En general, un compuesto de ácido nucleico que inhibe un receptor ActRII tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y opcionalmente la longitud será aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un compuesto de ácido nucleico que inhibe un receptor ActRII puede ser un ADN (particularmente para su uso como un antisentido), un ARN, o un híbrido ARN:ADN. Una cadena cualquiera puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como cualquiera de ADN o ARN. Asimismo, un compuesto de ácido nucleico bicatenario puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN, y una cadena 45 cualquiera también puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como cualquiera de ADN o ARN.

50 Los compuestos de ácido nucleico que inhiben un receptor de ActRII pueden incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, que incluyen una o modificaciones al esqueleto (la porción del fosfato de azúcar en un ácido nucleico natural, que incluye enlaces internucleotídicos) o la porción de base (la porción de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). En ciertas realizaciones, un compuesto de ácido nucleico antisentido tendrá una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y contendrá frecuentemente una o más modificaciones para mejorar ciertas características, tales como estabilidad en el suero, estabilidad en una célula o estabilidad en un lugar donde el compuesto es probable que se administre, tal como, por ejemplo, el estómago en el caso de compuestos administrados por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de una construcción de iARN, la cadena complementaria al transcripto diana será, en general, ARN o modificaciones del mismo. La otra cadena puede ser ARN, ADN, o cualquier otra variación. La porción de dúplex de construcción bicatenaria o monocatenaria de iARN de "horquilla" puede tener, en ciertas realizaciones, una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, mientras que sirva de un sustrato de Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y también pueden contener formas modificadas. En ciertas realizaciones, los compuestos de ácido nucleico que inhiben a los receptores ActRII pueden inhibir la expresión de su diana en aproximadamente 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, o más, en condiciones fisiológicas y a una concentración donde un control no sentido o sentido tiene poco o ningún efecto. Las concentraciones para probar el efecto de los compuestos de ácido nucleico incluyen 1, 5, 10 micromolar, o más.

En otras realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento son anticuerpos. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades de activina A o B, también denominadas β A o β B) y alteran la unión al receptor ActRII; y anticuerpos que se unen a polipéptidos del receptor ActRII (por ejemplo, un polipéptido ActRIIA soluble o ActRIIB soluble) y alteran la unión a activina.

Usando inmunógenos derivados de un polipéptido receptor de ActRII o un polipéptido de activina, se pueden preparar antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales por protocolos convencionales (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo se puede inmunizar con una forma inmunogénica del polipéptido receptor ActRII, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación con vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Una porción inmunogénica de un receptor ActRII o polipéptido de activina se puede administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede monitorizar por detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Se pueden usar ELISA convencional u otros inmunoensayos con el inmunogén como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido receptor ActRII, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policloniales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden recoger células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y fusionar por procedimientos habituales de fusión de células somáticas con células inmortalizantes, tales como células de mieloma para dar células de hibridoma. Dichas técnicas se conocen bien 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 linfocitos B humanos (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72) y la técnica VEB-hibridomas para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Se pueden cribar inmunquímicamente células de hibridoma para la producción de anticuerpos reactivos específicamente con un polipéptido receptor ActRII y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido objeto. Los anticuerpos pueden ser fragmentados usando técnicas convencionales y los fragmentos se criban para su utilidad del mismo modo que se ha descrito anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab)2 tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)2 resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. Se pretende además que un anticuerpo incluya moléculas biespecíficas, monocatenarias, químéricas, humanizadas y completamente humanas que tienen afinidad por un receptor ActRII o polipéptido de activina conferido por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede comprender además una marca unida al mismo y capaz de ser detectada (por ejemplo, la marca puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor de enzima).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, término que engloba cualquier anticuerpo generado en parte por técnicas de biología molecular, que incluyen anticuerpos injertados en CDR o químéricos, anticuerpos humanos u otros ensamblados de dominios de anticuerpo seleccionados de bibliotecas, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, proteínas V_H humanas o proteínas V_{HH} de camélido). En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, y en ciertas realizaciones. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido receptor ActRII o polipéptido de activina puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de antígeno eficaz para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obtener células productoras de anticuerpo (por ejemplo, células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpo con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y probar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo, donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal se puede purificar del cultivo celular.

El adjetivo "reactivo específicamente con", como se usa en referencia a un anticuerpo, pretende significar, como se entiende, en general, en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido receptor ActRII) y otros antígenos que no son de interés para los que el anticuerpo es útil, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser conveniente un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales tienen, en general, una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policloniales) para discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos que reaccionan de forma cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo: antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con un intervalo de afinidades diferentes, en general, los anticuerpos preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menos. Dada la unión extraordinariamente fuerte entre la activina y un receptor ActRII, se espera que un anticuerpo neutralizante anti-activina o anti-receptor ActRII tenga, en general, una constante de disociación de 10^{-10} o menos.

- Además, las técnicas usadas para cribar anticuerpos para identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se va a usar para la unión de un antígeno en disolución, se puede desear probar la unión en disolución. Están disponibles una variedad de diferentes técnicas para probar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen 5 ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore.TM., Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Md.), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.
- En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII que se van a usar en las composiciones y métodos 10 descritos en el presente documento incluyen formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión de receptor de tipo I que pueden unirse a receptores de tipo II y dejan de formar un complejo ternario activo. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos, tales como las moléculas antisentido, ARNip o ribozimas que inhiben activina A, B, C o E, o, particularmente, la expresión del receptor ActRII, se pueden usar en las composiciones y métodos 15 descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII que se van a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento presentan selectividad por la inhibición de la señalización mediada por GDF11 frente a otros miembros de la familia de TGF-beta, particularmente con respecto a GDF8 y activina.
- En otras realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en 20 el presente documento son proteínas distintas de anticuerpo con actividad de antagonista del receptor ActRII, que incluyen inhibina (es decir, subunidad de inhibina alfa), folistatina (por ejemplo, folistatina-288 y folistatina-315), Cerberus, proteína relacionada con folistatina ("FSRP"), endoglin, activina C, alfa(2)-macroglobulina y una activina A mutante M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108).
- En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRII que se va a usar en las composiciones y métodos 25 descritos en el presente documento es un polipéptido de folistatina que antagoniza la bioactividad de activina y/o se une a activina. El término "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de folistatina que existe de forma natural, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas 30 de peptidomimético) que retiene una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcional de folistatina. Las variantes de polipéptidos de folistatina que retienen propiedades de unión a activina se pueden identificar basándose en estudios previos que implican interacciones de folistatina y activina. Por ejemplo, el documento de patente WO2008/030367, que se incluye por referencia en el presente documento en su totalidad, desvela dominios específicos 35 de folistatina ("FSD") que se muestra que son importantes para la unión de activina. Los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tienen una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina, y opcionalmente al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad. Los ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de folistatina humano como se describen, por ejemplo, en el documento de patente WO2005/025601, que se incluye por referencia en el presente documento en su 40 totalidad.
- En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRII que se va a usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento es un gen relacionado de tipo folistatina (FLRG) que antagoniza la bioactividad de activina y/o se une a activina. El término "polipéptido de FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de FLRG que existe de forma natural, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas de peptidomimético) que retienen una actividad útil. Las variantes de polipéptidos FLRG que retienen 45 propiedades de unión a activina se pueden identificar usando métodos rutinarios para ensayar interacciones de FLRG y activina. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.537.966, que se incluye por referencia en el presente documento en su totalidad. Los polipéptidos de FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocido que tienen una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG, y opcionalmente al menos 50 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad.
- En ciertas realizaciones, variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y polipéptidos FLRG incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de folistatina o polipéptidos FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que facilitan el aislamiento, la detección, la estabilización o 55 la multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se tratan con detalle anteriormente con referencia a los polipéptidos ActRIIA y ActRIIB. En una realización, un inhibidor de la señalización de ActRII es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de folistatina fusionado con un dominio Fc. En otra realización, un inhibidor de la señalización de ActRII es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido FLRG fusionado con un dominio Fc.
- 60 8.6 ENSAYOS**
- Se pueden probar diversas variantes de polipéptidos ActRII, o variantes de polipéptidos ActRII solubles, para su capacidad para inhibir ActRII. Además, se pueden probar compuestos para su capacidad para inhibir ActRII. Una vez se confirman 65 los inhibidores de la señalización de ActRII, estos compuestos se pueden usar con los métodos proporcionados en el

presente documento. ActRII puede ser ActRIIA o ActRIIB. Los ensayos que siguen se describen para ActRIIA, pero se pueden realizar análogamente para ActRIIB.

8.6.1 EVALUACIÓN DEL NIVEL Y/O ACTIVIDAD DE SNAI1, FOSFOSMAD2, FOSFOSMAD3, PROTEÍNA URINARIA, DKK1, COL1A1, ACTIVINA (POR EJEMPLO, ACTIVINA LIBRE), RUNX2, ALP, BSAP, CTX, OSTERIX, KLOTHO, ALFA-SMA, MYOCD, ACTRIIA, AXIN2 Y/O SM22-ALFA

El nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento. Por ejemplo, el nivel de Sna1, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina, Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido puede determinarse evaluando (por ejemplo, cuantificando) el ARN transcrit de Snail, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina, Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la muestra usando, por ejemplo, transferencia Northern, análisis de PCR, análisis de PCR en tiempo real, o cualquier otra técnica conocida en la técnica o descrita en el presente documento. Un experto en la técnica reconocerá que los niveles y/o actividad de uno o más de Runx2, Alp, Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria pueden compararse independientemente y respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente, tal como se describe anteriormente en la Sección 8.3.1. En una realización, el nivel de Snail, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina, Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido puede determinarse evaluando (por ejemplo, cuantificando) el ARNm de Snail, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina, Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la muestra. En una realización específica, el nivel de ARNm de Snail, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina, Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR). En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Runx2 comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 58. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Alp comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 59. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Snail comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 74. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Dkk1 comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 75. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de col1a1 comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 76. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de activina comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 77. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Osterix comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 60. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Klobo comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 61. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de alfa-SMA comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 70. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de MYOCD comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 71. En una realización específica, la secuencia del ácido nucleico del ARNm de Sm22-alfa comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 62. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Runx2 (SEQ ID NO: 48 y 49) para determinar los niveles de Runx2. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Alp (SEQ ID NO: 50 y 51) para determinar los niveles de Alp. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Snail (SEQ ID NO: 78 y 79) para determinar los niveles de Sna1. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Dkk1 (SEQ ID NO: 80 y 81) para determinar los niveles de Dkk1. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de col1a1 (SEQ ID NO: 82 y 83) para determinar los niveles de col1a1. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de activina (SEQ ID NO: 84 y 85) para determinar los niveles de activina. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Osterix (SEQ ID NO: 52 y 53) para determinar los niveles de Osterix. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Klobo (SEQ ID NO: 54 y 55) para determinar los niveles de Klobo. En una realización específica, la qRT-PCR se lleva a cabo con cebadores específicos de Sm22-alfa (SEQ ID NO: 56 y 57) para determinar los niveles de Sm22-alfa.

El nivel de Sna1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido también puede determinarse evaluando (por ejemplo, cuantificando) el nivel de expresión de proteína de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klobo, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la muestra usando, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico, transferencia Western, ELISA, inmunoprecipitación, análisis de citometría de flujo, o cualquier otra técnica conocida en la técnica o descrita en el presente documento. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Runx2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Alp comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Snail comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Dkk1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de col1a1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína activina (por ejemplo, activina libre) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de BSAP comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Osterix comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Klotho comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de alfa-SMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la MYOCD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína Sm22-alfa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de la proteína de Axin2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En realizaciones particulares, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se determina por transferencia Western. En una realización particular, la actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se determina por análisis transferencia Western de una proteína modulada por Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 o SM22-alfa. En realizaciones particulares, el nivel de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se determina mediante un método capaz de cuantificar la cantidad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, presente en una muestra de tejido de un sujeto (por ejemplo, en suero humano), y/o capaz de detectar la corrección del nivel de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, tras el tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRII. En una realización, el nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido se determina evaluando (por ejemplo, cuantificando) la expresión de proteína de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la muestra usando ELISA. Por ejemplo, Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa pueden identificarse y cuantificarse en el suero humano usando el método de ELISA. El método de ELISA para su uso en la determinación del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, coll a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido puede comprender el recubrimiento de placas de ELISA con la muestra de tejido (por ejemplo, suero humano), y la detección de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la muestra de tejido (por ejemplo, suero humano) que se unen a anticuerpos específicos de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente. En algunas realizaciones, el método para su uso en la determinación del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa como se describe en el presente documento (por ejemplo, ELISA) es capaz de detectar a partir de 100 pg/ml de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Runx2 SC-390715 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Runx2. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Alp SC-98652 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Alp. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Snail sc-393172 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Snail. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de fosfoSmad2 sc-101801 (Santa Cruz) para determinar los niveles de fosfoSmad2. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de fosfoSmad3 sc-130218 (Santa Cruz) para determinar los niveles de fosfoSmad2. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Dkk1 sc-374574 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Dkk1. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de col1a1 sc-8784 (Santa Cruz) para determinar los niveles de col1a1. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de activina A1594 (Sigma Aldrich) para determinar los niveles de activina (ejemplo, activina libre). En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de BSAP SC-98652 (Santa Cruz) para determinar los niveles de BSAP. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de CTX ABIN1173415 (Antibodies Online) para determinar los niveles de CTX. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Osterix SC-22538 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Osterix. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Klotho SC-22218 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Klotho. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de alfa-SMA SC-53142 (Santa Cruz) para determinar los niveles de alfa-SMA. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de MYOCD SC-21561 (Santa Cruz) para determinar los niveles de

MYOCD. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de Sm22-alfa SC-271719 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Sm22-alfa. En una realización específica, el ELISA se realiza con el anticuerpo específico de ActRIIA ab135634 (Abcam) para determinar los niveles de ActRIIA.

- 5 Los niveles de uno o más de Runx2, Alp, Snai1, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria descritos en los ensayos de ELISA descritos en el presente documento pueden compararse independientemente y respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente, tal como se describe anteriormente en la Sección 8.3.1.
- 10 Los anticuerpos para su uso en ensayos que miden los niveles de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra (por ejemplo, en una muestra de tejido, por ejemplo, una muestra de aorta, sangre, suero, plasma, hígado, bazo y/o médula ósea) son conocidos en la técnica o podrían desarrollarse fácilmente usando enfoques conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Runx2 en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-B4293, LS-B4294, LS-B4296; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo sc-390715; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: WH0000860M1. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Alp en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-B2877, LS-B1844, LS-C169212; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-98652; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: SAB1405449. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Snail en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-C161335, LS-C198229 y LS-C169298; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-393172; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: SAB1404386. Ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de fosfoSmad2 en una muestra incluyen anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-101801; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con números de producto: SAB4200251 y SAB4300252. Ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de fosfoSmad3 en una muestra incluyen anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-130218; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con números de producto: SAB4300253 y SAB4504210. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Dkk1 en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-C108793, LS-C105116 y LS-C105117; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-374574; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: WH0022943M1. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de collal en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con número de catálogo LS-B5932; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-8784; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: C2456. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de activina (por ejemplo, activina libre) en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con número de catálogo LS-C308491; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: A1719. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de BSAP en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-B2877, LS-B1844, LS-C169212; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-98652; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: SAB 1405449. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de CTX en una muestra incluyen ABIN1173415 (Antibodies Online). Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Osterix en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-C139215, LS-C132610, LS-B6531; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-133871; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: WH0121340M1. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Klotho en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-C165587, LS-C145689, LS-C8376; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-22218; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: SAB1306662. Ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de alfa-SMA en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-B6000, LS-B5966, LS-B2161; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: SC-21561; y anticuerpos disponibles de Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: A5228. Ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de MYOCD en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-C37407, LS-C153495, LS-c137255; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: SC-53142; y anticuerpos disponibles de Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: M8948. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de Sm22-alfa en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-B2563, LS-C139114, LS-C210979; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo: sc-271719; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: SAB2501014.

Ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de ActRIIA en una muestra incluyen anticuerpos de Abcam con código de producto: ab135634.

La actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa puede medirse mediante cualquier ensayo conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, un ensayo de gen indicador (por ejemplo, que contenga construcción de gen indicador sensible a Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina, Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 o Sm22-alfa, respectivamente) o cualquier otro ensayo de bioactividad.

El nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa puede evaluarse en cualquier muestra de tejido obtenida de un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se evalúa en una muestra obtenida de aorta, suero, hígado, bazo o médula ósea de un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento. En una realización, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se evalúa en una muestra obtenida de suero de un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento. En otra realización, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se evalúa en una muestra obtenida de aorta, bazo, de un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento. En aún otra realización, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa se evalúa en una muestra obtenida de médula ósea de un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento.

Un experto en la técnica reconocerá que la actividad de uno o más de Runx2, Alp, Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria determinada usando ensayos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento puede compararse respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente, tal como se describe anteriormente en la Sección 8.3.1.

En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de un tejido de un sujeto se compara con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en muestras de tejido (por ejemplo, en muestras del mismo tejido) de una población de referencia como se describe en la Sección 8.6. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de un tejido de un sujeto se compara con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una muestra de tejido (por ejemplo, en una muestra del mismo tejido) del sujeto en un momento de tiempo anterior (por ejemplo, antes de la aparición de la enfermedad, antes del inicio del tratamiento, o durante el tratamiento). En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido (por ejemplo, aorta, suero, bazo, hígado o médula sanguínea) de un sujeto se compara con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho y/o Sm22-alfa, respectivamente, en otra muestra de tejido del sujeto. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido de un sujeto se compara con el nivel y/o actividad de otro producto génico en la muestra de tejido del sujeto (por ejemplo, b-actina, activina A, activina B).

En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido de un sujeto se compara con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la muestra de tejido en una población de referencia. En algunas realizaciones, la detección del nivel y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en comparación con el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia, va seguida de la administración de un inhibidor de la señalización del receptor de activina (tal como uno o más inhibidores de la señalización del receptor de activina descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, la administración de un inhibidor de la señalización del receptor de activina (tal como uno o más inhibidores de la señalización del receptor de activina descritos en el presente documento) va seguida de la monitorización

5 del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa y, opcionalmente, la comparación del nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En algunas realizaciones, la administración de una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRII (por ejemplo, ActRIIA-hFc, tal como SEQ ID NO:7) va seguida de la determinación del nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, y si el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, collal, Runx2, CTX, y/u Osterix aumenta en comparación con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, respectivamente, en una población de referencia, y/o si el nivel y/o actividad de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa disminuye en comparación con el nivel y/o actividad de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia, administrar una segunda dosis del inhibidor de la señalización de ActRII que sea superior (por ejemplo, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor) que la primera dosis, y si el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix disminuye 10 en comparación con el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, y/u Osterix, respectivamente, en una población de referencia, y/o si el nivel y/o actividad de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa aumenta en comparación con el nivel y/o actividad de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia, administrar una segunda dosis del inhibidor de la señalización de ActRII que sea inferior (por ejemplo, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces menor) que la primera dosis. En ciertas 15 realizaciones, la población de referencia es una población como se describe en la Sección 8.6.

20 En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en una muestra de tejido del sujeto tratado se compara con el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una muestra del mismo tejido de uno o más sujetos sanos. En algunas realizaciones, el tejido en el que se evalúa el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa es la aorta, el suero sanguíneo, la médula ósea, el hígado o el bazo. En una realización, el tejido en el que se evalúa el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa es el suero.

25 30 En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad elevado de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix es aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, 100%, 200%, o 500% mayor que el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, y/u Osterix, respectivamente, en una población de referencia; y/o los niveles reducidos de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, o 100% menores que el nivel y/o actividad de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad elevados de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix es igual o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, o 100% mayor que el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix, respectivamente, en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior de la población de referencia; y/o los niveles reducidos de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa son iguales 35 o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que el nivel y/o actividad de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior de la población de referencia. En ciertas realizaciones, la población de referencia es como se describe en la Sección 8.6.

40 45 50 En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad elevado de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa es aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, 100%, 200%, o 500% mayor que el nivel y/o actividad de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la población de referencia; y/o el nivel y/o actividad reducido de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix es aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, o 100% menor que el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix, respectivamente, en una población de referencia. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad elevado de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa es igual a o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayor que el nivel y/o actividad de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior en la población de referencia; y/o el nivel y/o actividad reducido de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix es igual a o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menor que el nivel y/o actividad de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior en la población de referencia. En ciertas realizaciones, la población de referencia es como se describe en la Sección 8.6.

65

En ciertas realizaciones, los niveles de activina son los niveles de activina libre, tales como, por ejemplo, activina no asociada con, por ejemplo, folistatina, 3 similar a la folistatina o inhibina. El nivel de activina libre puede determinarse, por ejemplo, (i) cuantificando la concentración de activina en una muestra, por ejemplo, en el plasma; (ii) cuantificando la concentración de proteínas que se asocian con activina, tales como, por ejemplo, folistatina, 3 similar a la folistatina e inhibina en la muestra; y (iii) calculando la relación estequiométrica de la concentración de activina a la concentración de las proteínas asociadas con activina.

Los ensayos descritos en el presente documento también pueden utilizarse para determinar el nivel y/o actividad de otras proteínas y/o transcritos, tales como, por ejemplo, FGF23, folistatina, 3 similar a la folistatina, inhibina, proteínas y/o transcritos implicados en la transición endotelial a mesenquimatosa.

En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa es en un tejido (por ejemplo, muestra de tejido). En ciertas realizaciones, el tejido es la aorta. En ciertas realizaciones, el tejido es el riñón. En ciertas realizaciones, el tejido es hueso. En ciertas realizaciones, el tejido es suero. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de Runx2, Dkk1, Alp, Osterix, Sm22-alfa, Klotho, alfa-SMA, ActRIIA, Axin2 y MYOCD están en la aorta. En una realización preferida, los niveles y/o la actividad de fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, ActRIIA, Axin2 y col1a1 están en el riñón. En una realización preferida, los niveles y/o actividad de la activina están en el suero. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de activina están en los miofibroblastos peritubulares. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de activina no están en el epitelio renal. En ciertas realizaciones, los niveles elevados de activina están en los miofibroblastos peritubulares, y los niveles elevados de activina no están en el epitelio renal.

Un experto en la técnica reconocerá que los niveles y/o actividad de uno o más de Runx2, Alp, Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y proteína urinaria pueden compararse independientemente y respectivamente con el nivel y/o actividad en una población de referencia correspondiente, tal como se describe anteriormente en la Sección 8.3.1.

8.6.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA

En ciertas realizaciones, los datos (por ejemplo, niveles de biomarcadores o síntomas clínicos) obtenidos de una población de referencia descrita en el presente documento se utilizan para determinar si los datos análogos obtenidos de un sujeto tratado o que se va a tratar según los métodos proporcionados en el presente documento son patológicamente altos (por ejemplo, elevados) o bajos (por ejemplo, reducidos).

En ciertas realizaciones, el tamaño de la población de referencia puede ser de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, o 1000 individuos. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en voluntarios aleatorios. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sanas. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que la población de pacientes como se describe en la Sección 8.4. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin calcificación vascular. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin enfermedad renal. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin enfermedad renal crónica. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin HVI. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas sin una enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de HVI.

En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes de la aparición de uno o más síntomas de enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes de la aparición de uno o más síntomas de calcificación vascular. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes de la aparición de uno o más síntomas de enfermedad renal crónica. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes de la aparición de uno o más síntomas de rigidez arterial. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes de la aparición de uno o más síntomas de HVI. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de la enfermedad cardiovascular en el sujeto. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de calcificación vascular en el sujeto. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de enfermedad renal crónica en el sujeto. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de enfermedad renal crónica de estadio 1. En ciertas

realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de enfermedad renal crónica de estadio 2. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de enfermedad renal crónica de estadio 3. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de enfermedad renal crónica de estadio 4. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de enfermedad renal crónica de estadio 5. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de niveles elevados de rigidez arterial en el sujeto. En ciertas realizaciones, la población de referencia se refiere a un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento antes del diagnóstico de HVI en el sujeto. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas que muestran un aumento de la rigidez arterial antes de ser tratadas según los métodos proporcionados en el presente documento o de ser diagnosticadas con una enfermedad descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, la población de referencia está formada por personas que muestran una tendencia ascendente de uno de los marcadores mencionados en el Sumario (véase la Sección 6) antes del tratamiento según los métodos proporcionados en el presente documento o de ser diagnosticadas con una enfermedad descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, la población de referencia consiste en personas que muestran un nivel elevado de Runx2, Alp, Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, fosfoSmad3 y/o proteína urinaria antes del tratamiento según los métodos descritos en el presente documento o de ser diagnosticadas con una enfermedad descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, la población de referencia está formada por personas que muestran una tendencia descendente de uno de los marcadores mencionados en el Sumario (véase la Sección 6) antes del tratamiento según los métodos descritos en el presente documento o de ser diagnosticadas con una enfermedad descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, la población de referencia está formada por personas que muestran un nivel reducido de alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa o ActRIIA antes del tratamiento según los métodos proporcionados en el presente documento o de ser diagnosticadas con una enfermedad descrita en el presente documento.

8.6.3 TRANSICIÓN ENDOTELIAL-MESENQUIMATOSA

En ciertos ejemplos, la EnMT en un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento puede monitorizarse mediante un ensayo de rastreo de linaje para determinar el destino de una población celular. En ciertos ejemplos, la EnMT en un sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento puede monitorizarse cuantificando el nivel y/o actividad de una o más proteínas o transcritos asociados con la EnMT, tales como, por ejemplo, Snai1.

8.6.4 RECAMBIO ÓSEO

Pueden usarse diversos marcadores circulantes del recambio óseo para diagnosticar trastornos óseos, tales como el recambio óseo lento. Los marcadores circulantes del recambio óseo son marcadores de la formación ósea, tales como la fosfatasa alcalina específica del hueso (bAP), la osteocalcina, el propéptido carboxiterminal del procolágeno de tipo I (PICP) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), siendo algunos marcadores de la resorción ósea, tales como la piridinolina, desoxipiridinolina, fosfatasa ácida resistente a tartrato(TRAP), TRAP de tipo 5b, piridinolina, desoxipiridinolina y telopeptido carboxiterminal del procolágeno de tipo I (ICTP), enlaces cruzados de colágeno en suero u orina (N-telopeptido o C-telopeptido) y 25 hidroxivitamina D. También pueden usarse ensayos para medir la molécula completa de la hormona paratiroides (PTH). El experto en la técnica conoce los métodos de obtención de imágenes que permiten la evaluación de la densidad mineral ósea (DMO), el volumen óseo, el volumen de hueso trabecular y el grosor trabecular. Véase, por ejemplo, Tilman B. Druke y Sharon M. Moe, Disturbances of bone and mineral metabolism in chronic kidney disease: an international initiative to improve diagnosis and treatment, Nephrol Dial Transplant (2004) 19: 534-536; Okuno S, Inaba M., Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Dialysis and bone metabolic marker, Clin Calcium. agosto 2009;19(8):1084-91; Herberth J, Monier-Faugere MC, Mawad HW, Branscum AJ, Herberth Z, Wang G, Cantor T, Malluche HH, The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 subjects, Clin Nephrol. 2009 Ju1;72(1):5-14; Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G., Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in subjects with chronic kidney disease Stages 3-5, Clin Nephrol. Octubre 2008;70(4):296-305; Driieke TB., Is parathyroid hormone measurement useful for the diagnosis of renal bone disease?, Kidney Int. marzo 2008;73(6):674-6; Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E, Nishizawa Y., Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in subjects with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction., Clin Endocrinol (Oxf). agosto 2008;69(2):189-96. Publicación electrónica 23 de enero de 2008. Véase también, Paul D. Miller, Diagnosis and Treatment of Osteoporosis in Chronic Renal Disease, 2009.

Otro marcador para monitorizar la resorción ósea en sujetos con ERC y disfunción renal leve es la concentración sérica de N-telopeptido de colágeno de tipo I (S-NTX). Véase, por ejemplo, Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Okada N, Imai E, Horio M, Ito T., Serum NTX is a practical marker for assessing antiresorptive therapy for glucocorticoid treated subjects with chronic kidney disease, Bone. Noviembre 2006;39(5):1067-72). Publicación electrónica 16 de junio de 2006.

También puede usarse tomografía computarizada cuantitativa (TCc) para determinar el recambio óseo.

Marcadores, tales como, por ejemplo, Runx2 y Alp, pueden evaluarse para monitorizar la transición osteoblástica en un sujeto. Marcadores, tales como, por ejemplo, Sm22-alfa, pueden evaluarse para monitorizar la función del músculo liso vascular y los niveles de células musculares lisas vasculares diferenciadas.

5

8.6.5 NIVELES DE CALCIO

Pueden analizarse los niveles de calcio mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el electrodo selectivo de iones calcio. En ciertas realizaciones, los niveles totales de calcio se miden en suero, 10 sangre, aorta u orina.

10

8.6.6 CALCIFICACIÓN VASCULAR

La tomografía computarizada (TC) sin contraste para obtener imágenes de la extensión de la calcificación de las arterias 15 coronarias (CAC) y la TC con contraste para la angiografía coronaria no invasiva (ATC) son desarrollos que se usan generalmente para diagnosticar la enfermedad coronaria obstructiva. También pueden usarse pruebas de esfuerzo con radionúclidos, escaneo de calcio en las arterias coronarias y angiografía coronaria no invasiva para la evaluación diagnóstica y pronóstica cardíaca. Véanse: Berman DS, Shaw LJ, Hachamovitch R, Friedman JD, Polk DM, Hayes SW, Thomson LE, Germane G, Wong ND, Kang X, Rozanski A., Comparative use of radionuclide stress testing, coronary artery 20 calcium scanning, and noninvasive coronary angiography for diagnostic and prognostic cardiac assessment, Semin Nucl Med. enero 2007;37(1):2-16.

Los resultados del escaneo de calcio coronario de sujetos asintomáticos pueden usarse como comparación. Por ejemplo, 25 los resultados del escaneo de calcio obtenidos antes de la aparición de la enfermedad renal pueden usarse como comparación cuando la calcificación vascular está relacionada con la enfermedad renal.

Los posibles métodos de detección y cuantificación de la calcificación de las arterias coronarias (CAC) incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada por rayos X y tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) de perfusión miocárdica. Moser KW, O'Keefe JH Jr, Bateman TM, McGhie IA., Coronary calcium screening in asymptomatic 30 subjects as a guide to risk factor modification and stress myocardial perfusion imaging, J Nucl Cardiol. 2003 nov-dic;10(6):590-8. También puede usarse tomografía computarizada multidetector (TCMD) para detectar la calcificación vascular (véase, por ejemplo, Burrill et al., 2007, Postgrad. Med. J. 83:985-698, 704).

Otro método de diagnóstico de la calcificación vascular es la captación de flúor 18 fluorodesoxiglucosa (FDG) en la pared 35 aórtica torácica en tomografía por emisión de positrones (PET)/tomografía computarizada (TC) combinadas. Véanse: Tatsumi M, Cohade C, Nakamoto Y, Wahl RL., Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis, Radiology. Dic. 2003;229(3):831-7. Publicación electrónica 30 de octubre de 2003.

Por ejemplo, puede usarse TC ultrarrápida para detectar la presencia de enfermedad coronaria aterosclerótica. Véase, 40 por ejemplo, Breen JF, Sheedy PF 2nd, Schwartz RS, Stanson AW, Kaufmann RB, Moll PP, Rumberger JA, Coronary artery calcification detected with ultrafast CT as an indication of coronary artery disease, Radiology. noviembre 1992;185(2):435-9.

También puede usarse tomografía computarizada por haz de electrones para diagnosticar la enfermedad arterial coronaria. 45 Véanse: Schmermund A, Baumgart D, Sack S, Möhlenkamp S, Grönemeyer D, Seibel R, Erbel R., Assessment of coronary calcification by electron-beam computed tomography in symptomatic subjects with normal, abnormal or equivocal exercise stress test, Eur Heart J. oct. 2000;21(20): 1674-82.

Otra prueba de la calcificación vascular se refiere a la composición de la placa en la hipertensión pulmonar plexogénica y 50 tromboembólica. La hipertensión pulmonar tromboembólica crónica se asocia a placas ateroscleróticas con núcleos pultáceos ricos en glicoforina, y la hipertensión pulmonar plexogénica a placas fibrosas. El material tromboembólico desempeña un papel fundamental en la formación de los núcleos pultáceos, de los que la glicoforina derivada de la membrana eritrocitaria es un componente principal. De este modo, se investiga la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica y plexogénica (primaria y secundaria (síndrome de Eisenmenger)). Véanse: Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovella F, Viganó M, Tavazzi L, Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary 55 hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation, Heart. agosto 2002;88(2):177-82.

Se puede usar la puntuación de Agatston, un sistema de puntuación del calcio basado en mediciones de la densidad de 60 las placas de calcio depositadas, para cuantificar la calcificación vascular. En este sistema, los niveles de calcificación vascular pueden medirse mediante tomografía computarizada multidetector (TCMD) y pueden evaluarse las atenuaciones en la tasa de progresión en la puntuación de Agatston (véase, por ejemplo, Sharma et al., 2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:603-611).

Además, la calcificación vascular puede evaluarse usando los métodos descritos en Adragao et al., 2004, Nephrol. Dial. 65 Transplant 19:1480-1488.

Otro ensayo para su uso en la cuantificación de la calcificación vascular en un sujeto es la puntuación de calcio específica de la lesión, que comprende un método de medición del calcio que resulta de una prueba de TC para la calcificación de las arterias coronarias. Este método se describe, por ejemplo, en Akram y Voros, 2008, Int. J. cardiovasc. Imaging 14:743-749.

5

8.6.7 TAMAÑO DEL CORAZÓN E HIPERTROFIA CARDÍACA

Pueden determinarse el tamaño del corazón y la hipertrofia cardíaca mediante cualquier método conocido por el experto, tal como, por ejemplo, resonancia magnética, electrocardiografía, ecocardiografía y tomografía computarizada cardíaca sin contraste.

10

8.6.8 RIGIDEZ ARTERIAL

Pueden determinarse los niveles de rigidez arterial mediante cualquier método conocido por el experto, tal como, por ejemplo, pruebas Doppler ultrasónicas, imágenes por resonancia magnética, incluida la arteriografía por resonancia magnética, tomografía computarizada (TC), incluida la angiografía por TC, y otras formas de angiografía conocidas en la técnica.

15

8.6.9 ENFERMEDAD RENAL

20

Pueden determinarse la tasa de filtración glomerular, el aclaramiento de inulina, la hiperfosfatemia y los niveles de BUN mediante cualquier método conocido por el experto para determinar la enfermedad renal. La fibrosis renal y/o la glomeruloesclerosis pueden diagnosticarse y/o controlarse por cualquier método conocido por el experto, tal como, por ejemplo, biopsia de tejido renal y examen del tejido para detectar cicatrización. La fibrosis renal y/o la glomeruloesclerosis también pueden diagnosticarse y/o controlarse, por ejemplo, midiendo la tasa de filtración glomerular y/o realizando una ecografía del riñón. Véase el sitio web de la National Kidney Foundation.

25

8.6.10 MODELOS ANIMALES

30

Pueden adquirirse machos ateroscleróticos *deficientes en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (ldlr-/-)* (acervo C57B1/6J) de Jackson Laboratories y alimentarse con una dieta hiperlipídica (42% de calorías procedentes de grasa) (Teklad #) a partir de las 12 semanas de edad. Los ratones son obesos, resistentes a la insulina a las 22 semanas de edad, diabéticos a las 28 semanas de edad e hipercolesterolémicos.

35

Se puede utilizar un procedimiento de dos etapas para crear una enfermedad renal crónica, como se ha descrito anteriormente (Davies, M.R., et al., 2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567; Davies, M.R., et al., 2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928). Puede aplicarse electrocauterio al riñón derecho a través de una incisión de 2 cm en el flanco a las 12 semanas posnatales, seguido de una nefrectomía total izquierda a las 14 semanas de edad. La intensidad del cauterio se varía para producir una lesión renal moderada (ERC-3) que se confirma mediante aclaramientos de inulina a las 20 semanas de edad. Un grupo de ratones de control, ratones C57B1/6J naturales, son alimentados con una dieta de comida normal, que es un grupo de función renal normal y dieta usado para los valores de control normativos. Un segundo grupo es ratones *ldlr-/-* alimentados con una dieta hiperlipídica y con operación simulada, que tienen una función renal normal, y sirven como grupo de control para determinar el efecto de la enfermedad renal. Un tercer grupo es ratones *ldlr-/-* con una FG reducida equivalente al estadio 3 de la ERC humana alimentados con una dieta hiperlipídica (ERC-3) con eutanasia a las 22 semanas, el grupo de calcificación vascular basal (ERC-3). El cuarto grupo es ratones *ldlr-/-* con ERC-3 que reciben inyecciones subcutáneas de vehículo dos veces por semana a partir de las 22 semanas hasta la eutanasia a las 28 semanas (ERC-3 V). El quinto grupo es ratones *ldlr-/-* con ERC-3 que reciben inyecciones subcutáneas de mActRIIA-Fc (Celgene, Summit, NJ), 10 mg/kg dos veces por semana a partir de las 22 semanas hasta la eutanasia a las 28 semanas (ERC-3 mActRIIA-Fc). La dosis usada demostró previamente en estudios FC/FD ser una dosis eficaz para la estimulación de la formación ósea (Lotinun, S., et al., 2010. Bone 46:1082-1088).

40

Un segundo modelo de ERC usado es el homólogo murino del síndrome de Alport ligado al cromosoma X, que es una deficiencia en el gen de la cadena a5 del colágeno de tipo IV, COL4A5 (Rheault, M.N., et al., 2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474). Se trata de un modelo de enfermedad renal espontánea. Pueden adquirirse parejas reproductoras de Jackson Laboratories y criarse para experimentos. Los machos hemigigotos desarrollan espontáneamente una enfermedad renal comparable a la ERC humana en estadio 3-4 a los 200 días del nacimiento.

45

Un tercer modelo de ERC es la ablación renal, similar al protocolo *ldlr-/-*, en una línea de ratón transgénico usada para el rastreo del linaje celular, el ratón GNZ. Se adquirieron ratones hembra indicadores GNZ (Stoller, J.Z., et al., 2008. Genesis (New York, N.Y. 2000) 46:200-204.) y el ratón macho transgénico Tek-Cre (Koni, P.A., et al., 2001. The Journal of Experimental Medicine 193:741-754.) de Jackson Laboratories y se criaron para producir ratones GNZ / Tek-Cre + para experimentos. Los compañeros de camada GNZ/ Tek-Cre - sirven como controles negativos. El genotipado de los ratones puede realizarse usando cebadores específicos recomendados por el fabricante para las razas de ratones GNZ y Tek-Cre.

50

Un tercero modelo de ERC es la ablación renal, similar al protocolo *ldlr-/-*, en una línea de ratón transgénico usada para el rastreo del linaje celular, el ratón GNZ. Se adquirieron ratones hembra indicadores GNZ (Stoller, J.Z., et al., 2008. Genesis (New York, N.Y. 2000) 46:200-204.) y el ratón macho transgénico Tek-Cre (Koni, P.A., et al., 2001. The Journal of Experimental Medicine 193:741-754.) de Jackson Laboratories y se criaron para producir ratones GNZ / Tek-Cre + para experimentos. Los compañeros de camada GNZ/ Tek-Cre - sirven como controles negativos. El genotipado de los ratones puede realizarse usando cebadores específicos recomendados por el fabricante para las razas de ratones GNZ y Tek-Cre.

55

8.6.11 ENSAYO DE RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL

En ciertas realizaciones, puede usarse un ensayo de respuesta de transcripción para probar un inhibidor de señalización de ActRII o la actividad de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa. Tras la señalización de ActRII, Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Osterix, Alp, BSAP, CTX, Klotho, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa, la transcripción de ciertos genes se regula al alza o a la baja. Se pueden medir un sistema de cultivo celular usado y la respuesta transcripcional (por ejemplo, mediante RT-PCR). El efecto de un agente sobre la respuesta transcripcional es una medida de su eficacia o actividad. En ciertas realizaciones, la región promotora que se sabe que responde a la señalización de ActRII, Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, collal, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Osterix, Alp, BSAP, CTX, Klotho, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa puede clonarse aguas arriba de un gen indicador. De este modo, el ensayo puede simplificarse de forma que solo sea necesario evaluar la actividad del gen indicador.

8.6.12 ENSAYOS DE CRIBADO

Se pueden probar diversas variantes de polipéptidos ActRII, o variantes de polipéptidos ActRII solubles, para su capacidad para inhibir ActRII. Además, se pueden probar compuestos para su capacidad para inhibir ActRII. Una vez se confirman los inhibidores de señalización de ActRII, estos compuestos se pueden usar con los métodos proporcionados en el presente documento. ActRII puede ser ActRIIA o ActRIIB. Los ensayos que siguen se describen para ActRIIA, pero se pueden realizar análogamente para ActRIIB.

Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRIIA sobre la expresión de genes implicados en la producción de hueso o destrucción de hueso. Esto se puede realizar, según se necesite, en presencia de una o más proteínas de ligando de ActRIIA recombinante (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido ActRIIA y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActRIIA. Asimismo, un polipéptido ActRIIA se puede administrar a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más propiedades del hueso, tales como densidad o volumen. También se puede evaluar la tasa de consolidación de las fracturas óseas. La absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA) es una técnica bien establecida, no invasiva y cuantitativa para evaluar la densidad ósea en un animal. En seres humanos se pueden usar sistemas de DEXA centrales para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores factores pronósticos de la densidad ósea global. Se pueden usar sistemas de DEXA periféricos para evaluar la densidad ósea en huesos periféricos, que incluyen, por ejemplo, los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Se pueden usar sistemas de obtención de imágenes por rayos X tradicionales, que incluyen TAC, para evaluar el crecimiento de hueso y la consolidación de la fractura. Además, la densidad ósea se puede medir usando tomografía computarizada cuantitativa (TCc). También se puede evaluar la resistencia mecánica del hueso.

En ciertos aspectos, en el presente documento se proporciona el uso de polipéptidos ActRIIA (por ejemplo, polipéptidos ActRIIA solubles) y polipéptidos de activina para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la vía de señalización de activina-ActRIIA. Los compuestos identificados mediante esta selección se pueden probar para evaluar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización óseos *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos se pueden probar además en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido *in vivo*.

Existen numerosos enfoques para cribar agentes terapéuticos para modular el crecimiento de tejido por direccionamiento de activina y polipéptidos ActRIIA. En ciertas realizaciones, el cribado de alta resolución de compuestos se puede llevar a cabo identificando agentes que perturban los efectos mediados por activina o ActRIIA sobre el hueso. En ciertas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIA a activina. Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIA a activina. En una realización adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con un polipéptido de activina o ActRIIA.

Será suficiente una variedad de formatos de ensayo y, en vista de la presente divulgación, aquellos no explícitamente descritos en el presente documento serán, sin embargo, comprendidos por un experto habitual en la técnica. Como se describe en el presente documento, los compuestos de prueba (agentes) usados en el presente documento pueden ser creados por cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas que existen de forma natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) a probar para su capacidad para actuar de moduladores del crecimiento de tejido se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levadura, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, que incluyen peptidomiméticos), o producidos recombinantemente. Los compuestos de prueba contemplados en el presente documento incluyen moléculas orgánicas no de peptidilo, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas del ácido nucleico. En una realización específica, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 dáltones.

Los compuestos de prueba se pueden proporcionar como entidades discretas individuales, o proporcionar en bibliotecas de mayor complejidad, tales como preparadas por química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en o una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en etapas de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden ser derivatizados con

otros compuestos y tener grupos de derivatización que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticulantes fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

- 5 En muchos programas de selección de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alta resolución para maximizar el número de compuestos analizados en un periodo de tiempo dado. Se prefieren frecuentemente ensayos que se realizan en sistemas sin células, tal que se puedan derivar con proteínas purificadas o semipurificadas, como cribados "primarios" ya que se pueden generar para permitir el rápido desarrollo y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba pueden ser, en general, ignorados en el sistema *in vitro*, estando el ensayo en su lugar centrado principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIA y activina.
- 10 15 Simplemente para ilustración, en un ensayo de cribado a modo de ejemplo, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIA aislado y purificado que es, en general, capaz de unirse a activina. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIA se añade entonces una composición que contiene un ligando de ActRIIA. La detección y cuantificación de complejos de ActRIIA/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciamiento) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIA y activina. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de respuesta a dosis de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar un nivel basal para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActRIIA, y la formación del complejo ActRIIA/activina se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, se puede variar el orden en el que los reactantes se pueden mezclar, y se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos celulares y lisados para obtener un sistema de ensayo sin células adecuado.
- 20 25 30 La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIA y activina se puede detectar mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede ser cuantificada usando, por ejemplo, proteínas detectablemente marcadas, tales como polipéptido ActRIIA radiomarcado (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C o ³H), fluorescentemente marcado (por ejemplo, FITC) o enzimáticamente marcado, o activina, por inmunoensayo, o por detección cromatográfica.
- 35 40 En ciertas realizaciones, en el presente documento se 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 indirecta, del grado de interacción entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y la patente de EE. UU. n.º 5.677.196), resonancia de plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas realizaciones descritas en el presente documento.
- 45 50 55 60 65 Ademá, se puede usar un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). En una realización específica, en el presente documento se contempla el uso de sistemas inversos de dos híbridos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian interacciones entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; y las patentes de EE. UU. n.º 5.525.490, 5.955.280; y 5.965.368.
- En ciertos aspectos, en el presente documento se describen métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación de hueso y aumentar la masa ósea. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado se puede probar en células completas o tejidos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización óseos.

Se pueden utilizar para este fin diversos métodos conocidos en la técnica. En particular, los compuestos se pueden probar por su capacidad para aumentar el recambio óseo.

- 5 Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIA o activina o compuestos de prueba sobre el crecimiento de hueso o cartílago se puede determinar midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos basados en células (véase, por ejemplo, Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye analizar la actividad osteogénica de los polipéptidos de ActRIIA o activina objeto y compuestos de prueba en células progenitoras y osteoblásticas mesenquimatosas. Para ilustración, se pueden construir adenovirus recombinantes que expresan una activina o polipéptido ActRIIA para infectar células C3H10T1/2 progenitoras mesenquimatosas pluripotentes, células C2Cl2 preosteoblásticas y células TE-85 osteoblásticas. La actividad osteogénica se determina entonces midiendo la inducción de fosfatasa alcalina, osteocalcina y mineralización de la matriz (véase, por ejemplo, Cheng et al., J Bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52).
- 10 15 En el presente documento también se describen ensayos *in vivo* para medir el crecimiento de hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001) desvela un modelo osteoporótico de rata en el que se estudia la reparación ósea durante el periodo inicial después de la fractura. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) también desvela un modelo osteoporótico de rata en el que se estudia la reparación ósea durante el periodo tardío después de la fractura. Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537 describen un modelo de osteoporosis de ratón en el que los ratones son ovariectomizados, que hace que los ratones pierdan un contenido sustancial de hueso mineral y densidad mineral ósea, perdiendo el hueso trabecular aproximadamente el 50% de densidad mineral ósea. La densidad ósea se podría aumentar en los ratones ovariectomizados por administración de factores, tales como hormona paratiroides. En ciertos aspectos, se pueden usar los ensayos de consolidación de fracturas que se conocen en la técnica. Estos ensayos incluyen técnica de fractura, análisis histológico y análisis biomecánico, que se describen en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.521.750.
- 20 25

8.7 DOSIS DE INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ACTIVINA DE TIPO II

- 30 En ciertas realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII es un inhibidor de la señalización de ActRIIA como se establece en la Sección 8.5.1. En otras realizaciones, un inhibidor de ActRII es un inhibidor de la señalización de ActRIIB como se establece en la Sección 8.5.2. En ciertas realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII es una combinación de un inhibidor de la señalización de ActRIIA y un inhibidor de la señalización de ActRIIB.

- 35 En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII se administra en intervalos y cantidades suficientes para lograr concentraciones en suero de 0,2 microgramos/kg o mayores, y niveles en suero de 1 microgramo/kg o 2 microgramos/kg o mayores que son deseables para lograr efectos significativos sobre la densidad ósea y la resistencia. Las pautas posológicas se pueden diseñar para alcanzar concentraciones en suero de entre 0,2 y 15 microgramos/kg, y opcionalmente entre 1 y 5 microgramos/kg. En seres humanos, los niveles en suero de 0,2 microgramos/kg se pueden lograr con una dosis única de 0,1 mg/kg o mayor y los niveles en suero de 1 microgramo/kg se pueden lograr con una dosis única de 0,3 mg/kg o mayor. La semivida en suero observada de la molécula es entre aproximadamente 20 y 30 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión de Fc, y así se puede lograr un nivel en suero eficaz sostenido, por ejemplo, por administración de 0,2-0,4 mg/kg semanalmente o cada dos semanas, o se pueden usar dosis más altas con intervalos más largos entre administraciones. Por ejemplo, dosis de 1-3 mg/kg se podrían usar mensualmente o cada dos meses, y el efecto sobre el hueso puede ser suficientemente duradero de forma que la administración sea necesaria solo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses. Los niveles en suero del inhibidor de la señalización de ActRII se pueden medir mediante cualquier medio conocido por el experto. Por ejemplo, los anticuerpos contra el inhibidor de la señalización de ActRII se pueden usar para determinar niveles en suero del inhibidor de la señalización de ActRII usando, por ejemplo, un ELISA.
- 40 45

- 50 En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRII varía desde 0,01 hasta 3,0 mg/kg por vía intravenosa o desde 0,03 hasta 0,1 mg/kg por vía subcutánea. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRII es de aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,0 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3,0 mg/kg, aproximadamente 3,5 mg/kg, aproximadamente 4,0 mg/kg, aproximadamente 4,5 mg/kg o aproximadamente 5,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRII es de aproximadamente 10,0 mg/kg, aproximadamente 15,0 mg/kg, aproximadamente 20,0 mg/kg, aproximadamente 25,0 mg/kg o aproximadamente 30,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRII es entre 0,01 mg/kg y 0,1 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg, entre 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,3 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg, entre 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg, entre 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg, entre 2,0 mg/kg y 3,0 mg/kg, entre 2,0 mg/kg y 4,0 mg/kg, entre 3,0 mg/kg y 5,0 mg/kg, entre 5,0 mg/kg y 10,0 mg/kg, entre 10,0 mg/kg y 15,0 mg/kg, entre 10,0 mg/kg y 20,0 mg/kg, entre 15,0 mg/kg y 20,0 mg/kg, o entre 20,0 mg/kg y 30,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg o aproximadamente 1 g. En ciertas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,3
- 55 60 65

mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,7 mg/kg.

5 En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis farmacéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es de aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, o aproximadamente 1 g, o de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,3 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,7 mg/kg.

10 15 En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, o aproximadamente 1 g, o de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,3 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,7 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra (i) una vez cada 28 días; o (ii) una vez cada 42 días. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 21 días.

20 25 30 35 40 45 50 En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 días. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial se administra una vez cada 2 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg y se administra una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,8 mg/kg y se administra una vez cada 2 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg y se administra una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg y se administra una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es de aproximadamente 0,3 mg/kg y se administra una vez cada 2 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es aproximadamente 0,5 mg/kg y se administra una vez cada 2 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es aproximadamente 0,7 mg/kg y se administra una vez cada 2 semanas. En ciertas realizaciones, la dosis inicial es aproximadamente 0,8 mg/kg y se administra una vez cada 2 semanas.

55 En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis ajustada. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es mayor que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 35 mg superior a la dosis inicial, o aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg superior a la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra más frecuentemente que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra cada 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35 o 40 días.

60 65 En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es menor que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada es aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 35 mg menos que la dosis inicial, o aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg menos que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra menos frecuentemente que la dosis inicial. En ciertas realizaciones, la dosis ajustada se administra cada 30, 35, 40, 42, 50, 60, 70, 80 o 90 días.

En ciertas realizaciones, la dosis se administra mediante inyección. En ciertas realizaciones, la dosis se administra una vez cada 28 días o una vez cada 42 días. En ciertas realizaciones, la dosis se administra de forma continua y/o indefinida.

- 5 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles y/o actividad de activina en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles y/o actividad de activina en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la activina es activina libre, por ejemplo, activina no asociada con folistatina, 3 similar a la folistatina o inhibina. En ciertas realizaciones, la activina es activina A. En ciertas realizaciones, los niveles y/o la actividad de activina se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- 10 15 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la señalización dependiente de Smad en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la señalización dependiente de Smad en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la señalización dependiente de Smad se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- 20 25 30 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles y/o actividad de Runx2 en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles y/o actividad de Runx2 en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Runx2 se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- 35 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles y/o actividad de Alp en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles y/o actividad de Alp en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Alp se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- 40 45 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles y/o actividad de Snail en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles y/o actividad de Snail en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Snail se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- 50 55 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles y/o actividad de fosfoSmad2 en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles y/o actividad de fosfoSmad2 en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de phosphosmad2 se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- 60 65 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles y/o actividad de fosfoSmad3 en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles y/o actividad de fosfoSmad3 en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de phosphosmad3 se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar los niveles y/o actividad alfa-SMA en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o como máximo en un 500% en comparación con los niveles y/o actividad de alfa-SMA en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de alfa-SMA se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar los niveles y/o actividad de MYOCD en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o como máximo en un 500% en comparación con los niveles y/o actividad de MYOCD en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de MYOCD se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar los niveles y/o actividad de Axin2 en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o como máximo en un 500% en comparación con los niveles y/o actividad de Axin2 en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Axin2 se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar los niveles de proteína de músculo liso vascular, tal como, por ejemplo, Sm22-alfa, en el sujeto en comparación con los niveles de proteína de músculo liso vascular de la población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de la proteína de músculo liso vascular se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o como máximo en un 500% en comparación con los niveles y/o actividad de Sm22-alfa en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles y/o actividad de Sm22-alfa se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar el volumen óseo en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con el volumen óseo en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, el volumen óseo se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la superficie de fosas de osteoclastos en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la superficie de fosas de osteoclastos en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la superficie de fosas de osteoclastos se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para mantener las tasas de formación ósea en el sujeto, o aumentar o disminuir mínimamente las tasas de formación ósea en el sujeto, tal como, como máximo en un 1%, 2,5%,

5%, 10% o 15% en comparación con las tasas de formación ósea en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la tasa de formación ósea se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

- 5 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIL administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para mantener la superficie de osteoblastos en el sujeto, o aumentar o disminuir mínimamente la superficie de osteoclastos en el sujeto, tal como, como máximo en un 1%, 2,5%, 5%, 10% o 15% en comparación con la superficie de osteoblastos en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la superficie de osteoblastos se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
10

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la transición osteoblástica aórtica en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la transición osteoblástica aórtica en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la transición osteoblástica aórtica se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

- 20 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir el número de osteoblastos en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con el número de osteoblastos en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, el número de osteoblastos se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

25

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la relación entre la superficie de osteoblastos y la superficie ósea en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la relación entre la superficie de osteoblastos y la superficie ósea en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la relación entre la superficie de osteoblastos y la superficie ósea se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir el número de osteoclastos en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con el número de osteoclastos en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, el número de osteoclastos se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

- 45 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la relación entre la superficie de osteoclastos y la superficie ósea en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la relación entre la superficie de osteoclastos y la superficie ósea en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la relación entre la superficie de osteoclastos y la superficie ósea se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

50

- 55 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar el volumen de hueso trabecular en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o en al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% o en como máximo en un 500% en comparación con el volumen de hueso trabecular en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, el volumen de hueso trabecular se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

- 65 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar el grosor trabecular en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%,

150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o en al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% o en como máximo en un 500% en comparación con el grosor trabecular en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas 5 realizaciones, el grosor trabecular se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar la función muscular lisa vascular en el sujeto en al 10 menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o en al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o en como máximo en un 500% en comparación con la función 15 muscular lisa vascular en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la función muscular lisa vascular se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la calcificación vascular en el sujeto en al menos 20 un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la calcificación vascular en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la calcificación vascular se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la 25 dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles de calcio vascular en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles de calcio vascular en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles de calcio vascular se 30 determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles de calcio aórtico en el sujeto en al 35 menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los niveles de calcio aórtico en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles de calcio aórtico se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos 40 proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los depósitos de calcio en ateromas aórticos en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con los depósitos de calcio en ateromas aórticos en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los depósitos de calcio en ateromas aórticos se determinan mediante un ensayo 45 como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir la transición endotelial a mesenquimatosa (EnMT) 50 inducida por la ERC en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la EnMT en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la EnMT se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir el tamaño del corazón (por ejemplo, peso del 55 corazón) en el sujeto en al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o en al menos un 10%, o en al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o en al menos un 10% en comparación con el tamaño del corazón (por ejemplo, peso del corazón) en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, el tamaño del corazón se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar los niveles de células musculares lisas vasculares 65 diferenciadas en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

- 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o en al menos en un 500%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% o en como máximo en un 500% en comparación con los niveles de células musculares lisas vasculares diferenciadas en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles de células musculares lisas vasculares diferenciadas se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles elevados de rigidez arterial en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, o como máximo en un 100% en comparación con la rigidez arterial en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la rigidez arterial se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para disminuir los niveles elevados de rigidez arterial en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o como máximo en un 100% en comparación con la rigidez arterial en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la rigidez arterial se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para mantener la tasa de aposición mineral en el sujeto, o aumentar o disminuir mínimamente la tasa de aposición mineral en el sujeto, tal como, como máximo en un 1%, 2,5%, 5%, 10% o 15% en comparación con la tasa de aposición mineral en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la tasa de aposición mineral se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para mantener la hipofosfatemia en el sujeto, o aumentar o disminuir mínimamente la hipofosfatemia en el sujeto, tal como, como máximo en un 1%, 2,5%, 5%, 10% o 15% en comparación con la hipofosfatemia en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la hipofosfatemia se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para mantener los niveles de FGF23 en el sujeto, o aumentar o disminuir mínimamente los niveles de FGF23 en el sujeto, tal como, como máximo en un 1%, 2,5%, 5%, 10% o 15% en comparación con los niveles de FGF23 en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, los niveles de FGF se determinan mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para reducir la fibrosis renal en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o como máximo en un 100% en comparación con la fibrosis renal en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la fibrosis renal se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para reducir la glomeruloesclerosis en el sujeto en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o al menos en un 100%, o como máximo en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o como máximo en un 100% en comparación con la glomeruloesclerosis en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6). En ciertas realizaciones, la glomeruloesclerosis se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6.
- En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para normalizar los niveles de uno o más de los biomarcadores proporcionados en el presente documento (por ejemplo, Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3 y/o proteína urinaria). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para aumentar o disminuir los niveles de uno o más de los biomarcadores proporcionados en el presente documento (por ejemplo, Runx2, Snai1, fosfoSmad2, col1a1, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3

y/o proteína urinaria) a los niveles de los biomarcadores respectivos en una población de referencia (por ejemplo, una población de referencia como se describe en la Sección 8.6).

- 5 En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para tratar y/o prevenir la hipertrofia cardíaca en el sujeto. En ciertas realizaciones, la hipertrofia cardíaca se determina mediante un ensayo como se describe en la Sección 8.6. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento es suficiente para tratar y/o prevenir la HVI en el sujeto.
- 10 Cuando se usa junto con una dosis proporcionada en el presente documento (por ejemplo, una dosis de un inhibidor de la señalización de ActRII o una dosis de un segundo agente activo), la palabra "aproximadamente" se refiere a cualquier número dentro de 1, 5 o 10% del número referenciado.
- 15 En ciertas realizaciones, un inhibidor de la señalización de ActRII como se describe en el presente documento se administra a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento por vía subcutánea o intravenosa.
- En ciertas realizaciones, se administran 0,13 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía subcutánea a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, se administran 0,26 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía subcutánea a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, se administran 0,1 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía intravenosa a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, se administran 0,2 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía intravenosa a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 14 días. En ciertas realizaciones, se administran 0,3 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía subcutánea a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 28 días. En ciertas realizaciones, se administran 0,5 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía subcutánea a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 28 días. En ciertas realizaciones, se administran 0,7 mg/kg de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7) por vía subcutánea a un sujeto tratado según los métodos proporcionados con un intervalo de una vez cada 28 días.

30 8.8 TERAPIA COMBINADA

- En ciertas realizaciones, los métodos se llevan a cabo en combinación con un segundo agente farmacéuticamente activo. Dicha terapia combinada puede lograrse mediante la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento. Además, cuando se administran como un componente de dicha terapia combinada, el inhibidor de la señalización de ActRII y el segundo agente farmacéuticamente activo pueden ser sinérgicos, de manera que la dosis diaria de uno o ambos componentes puede reducirse en comparación con la dosis de cualquiera de los componentes que normalmente se administraría como monoterapia. Alternativamente, cuando se administra como un componente de dicha terapia combinada, el inhibidor de la señalización de ActRII proporcionado en el presente documento y el segundo agente farmacéuticamente activo pueden ser aditivos, de manera que la dosis diaria de cada uno de los componentes es similar o igual a la dosis de cualquiera de los componentes que normalmente se administraría como monoterapia.

- En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII se administra el mismo día que un segundo agente farmacéuticamente activo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII se administra uno, dos, tres o más días antes que un segundo agente farmacéuticamente activo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII se administra uno, dos, tres o más días después de un segundo agente farmacéuticamente activo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII se administra una, dos, tres o más semanas después de un segundo agente farmacéuticamente activo.

- 50 En ciertas realizaciones, el segundo agente farmacéuticamente activo es un antagonista de Snail, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, Dkk1, col1a1, activina (por ejemplo, activina libre), Runx2, Alp, BSAP, CTX y/u Osterix, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, un inhibidor de señalización de molécula pequeña, un ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico interferente pequeño, una proteína negativa dominante o fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, el segundo agente farmacéuticamente activo es un agonista de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo o una molécula pequeña.

- En ciertas realizaciones, el segundo agente farmacéuticamente activo es un agente activo usado para tratar enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, y/o enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de enfermedad renal, tales como, por ejemplo, un inhibidor de la señalización de aldosterona, un bloqueante de los receptores de angiotensina II, un betabloqueante, un bloqueante de los canales de calcio, un fármaco reductor del colesterol, digoxina, un diurético, una terapia inotrópica, potasio o magnesio, un vasodilatador y/o warfarina.

- 65 En ciertas realizaciones, el segundo agente farmacéuticamente activo es un agente activo usado para tratar enfermedad renal crónica, tal como, por ejemplo, un bloqueante de los receptores de angiotensina II, un betabloqueante, un bloqueante

de los canales de calcio, un inhibidor directo de la señalización de la renina, un diurético, un vasodilatador, un tratamiento con eritropoyetina, un tratamiento de sustitución con hierro y/o vitamina D.

5 En ciertas realizaciones, los métodos se llevan a cabo en combinación con un método para tratar o mejorar enfermedad cardiovascular, calcificación vascular, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la calcificación vascular, y/o enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de la enfermedad renal, y/o enfermedad renal crónica.

8.9 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

10 En ciertas realizaciones, los antagonistas de activina-ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRII) se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso con los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido ActRII solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto se pueden formular para administración en cualquier modo conveniente para su uso en medicina o veterinaria. ActRII puede ser ActRIIA o ActRIIB.

15 En ciertas realizaciones, los métodos terapéuticos proporcionados en el presente documento incluyen la administración de la composición (que comprende un inhibidor de la señalización de ActRII) sistémicamente, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para los usos proporcionados en el presente documento está en una forma fisiológicamente aceptable y libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles 20 distintos de los antagonistas de ActRII que también se pueden incluir opcionalmente en la composición que se ha descrito anteriormente se pueden administrar simultáneamente o uno detrás de otro con los compuestos objeto (por ejemplo, polipéptidos ActRII, tales como polipéptidos ActRIIA y/o ActRIIB (véase la Sección 8.5)).

25 Normalmente, los antagonistas de ActRII se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRII en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la 30 formulación en 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 para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propileneglicol, polietileneglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluididad apropiada, por ejemplo, usando materiales 35 de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para la administración a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente 40 documento pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIA) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser resorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar liberación lenta de los polipéptidos ActRIIA. Dichas matrices se pueden formar de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

45 La elección del material matriz se basa en biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones objeto definirán la formulación apropiada. Posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio biodegradable y químicamente definido, fosfato de tricalcio, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos. Otros posibles materiales son biodegradables y 50 biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices comprenden proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras posibles matrices son no biodegradables y están químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otros cerámicos. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcio. Los biocerámicos se pueden alterar en la composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato, y procesar para alterar el tamaño de poro, tamaño de partículas, forma de la partícula y 55 biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente documento (que comprenden el inhibidor de la señalización de ActRII) se puede administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En formas farmacéuticas sólidas para administración por vía oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos y similares), se puede mezclar uno o más compuestos terapéuticos descritos en el presente documento con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o sustancias de relleno, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, patata o almidón de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura usando excipientes, tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Formas farmacéuticas líquidas para administración por vía oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, 25 aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

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

30 Las composiciones descritas en el presente documento también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede garantizar por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsóbico, y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las 35 composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que la pauta posológica será determinada por el médico adjunto considerando diversos factores que 40 modifican la acción de los compuestos descritos en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos ActRII, tales como polipéptidos ActRIIA y/o ActRIIB (véase la Sección 8.5)). Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, cantidad de peso de hueso que se desea formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio de daño óseo, la condición del hueso dañado, la edad del sujeto, sexo y dieta, la intensidad de cualquier enfermedad que pueda ser que contribuya a la pérdida de hueso, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosis puede variar con el tipo de matriz usado en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición. La adición de otros factores de crecimiento 45 conocidos a la composición final también puede afectar la dosis. El progreso se puede monitorizar por evaluación periódica del crecimiento y/o reparación ósea, por ejemplo, rayos X (incluyendo DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcado con tetraciclinas.

50 En el presente documento se desvela una terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos ActRII. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico por introducción de las secuencias de polinucleótidos ActRII en células o tejidos que tienen los trastornos que se enumeraron anteriormente. La administración de secuencias de polinucleótidos ActRII se puede lograr usando un vector de expresión recombinante, tal como un virus químérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos ActRII se prefiere el uso de liposomas dirigidos. Los polipéptidos ActRII pueden ser polipéptidos ActRIIA y/o ActRIIB (véase la Sección 8.5)).

55 Diversos vectores víricos que se pueden utilizar para la genoterapia como se enseña en el presente documento incluyen adenovirus, virus del herpes, variolovacuna o, preferentemente, un virus de ARN, tal como un retrovirus. Preferentemente, el vector retrovírico es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovíricos en los que un gen extraño individual se puede insertar 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). Varios vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador de selección de manera que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovíricos se pueden hacer específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se lleva a cabo usando un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que 60 las secuencias de polinucleótidos específicas se pueden insertar en el genoma retrovírico o unir a una envoltura vírica.

para permitir la administración específica de diana del vector retrovírico que contiene el polinucleótido ActRII. Preferiblemente, el vector se dirige a hueso o cartílago.

Alternativamente, el cultivo de células de tejido se puede transfectar directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovíricos gag, pol y env, por transfección convencional con fosfato de calcio. Estas células se transfectan entonces con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovírico en el medio de cultivo.

Otra administración elegida como sistema diana para polinucleótidos ActRII es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido para su uso en los métodos descritos en el presente documento es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Se pueden encapsular ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y se administran a células en una forma biológicamente activa (véase por ejemplo, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Se conocen en la técnica métodos para la eficiente transferencia génica usando un vehículo de liposoma, véase por ejemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, 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, fosfatidilslerina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de liposomas también es posible basándose en, por ejemplo, la especificidad por órgano, la especificidad por célula y la especificidad por orgánulo y se conoce en la técnica.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRII está sustancialmente puro en una composición farmacéutica. Específicamente, como máximo 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,1%, o como máximo 0,05%, de los compuestos en la composición farmacéutica son compuestos distintos del inhibidor de la señalización de ActRII y el vehículo farmacéuticamente aceptable.

8.10 KITS

Se divulga en el presente documento un kit que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más reactivos para determinar el nivel de uno o más biomarcadores descritos en el presente documento (por ejemplo, Runx2, Alp, Snail, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, ActRIIA, Axin2 y proteína urinaria) en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de un biomarcador descrito en el presente documento (por ejemplo, Runx2, Alp, Snai1, fosfoSmad2, Dkk1, collal, activina, BSAP, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, Sm22-alfa, fosfoSmad3, ActRIIA, Axin2 y proteína urinaria) en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Runx2 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de A1p en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Snai1 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de phosphosmad2 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Dkk1 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de col1a1 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de activina en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de BSAP en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de CTX en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Osterix en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Klotho en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de alfa-SMA en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de MYOCD en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Sm22-alfa en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de phosphosmad3 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de proteína urinaria en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de ActRIIA en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el kit comprende uno o más reactivos para determinar el nivel de Axin2 en una muestra obtenida de un sujeto descrito en el presente documento.

descrito en el presente documento. En ciertos ejemplos, el uno o más reactivos para determinar el nivel del biomarcador es como se describe en la Sección 8.6.1. En ciertos ejemplos, el kit comprende además ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7). En ciertos ejemplos, el kit comprende además un segundo recipiente que comprende ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7).

5 9. EJEMPLOS

Los ejemplos presentados en el presente documento demuestran que los niveles de ARNm de Runx2, Alp, BSAP, CTX y Osterix son elevados y que los niveles de ARNm de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y Sm22-alfa pueden disminuir en ciertas formas de enfermedad renal crónica. Estos ejemplos demuestran además que el tratamiento con un ligando trampa de activina disminuye los niveles de ARNm de Runx2, Alp, CTX, ActRIIA y/u Osterix y aumenta los niveles de ARNm de Klotho, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, lo que se asocia con una disminución de la calcificación vascular. En consecuencia, los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran que Runx2, Alp, CTX, Osterix, Klotho, alfa-SMA, MYOCD, ActRIIA, Axin2 y/o Sm22-alfa pueden usarse como biomarcador(es) para tratar enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular, enfermedades cardiovasculares asociadas a y/o resultantes de calcificación vascular, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal, niveles elevados de rigidez arterial, enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de niveles elevados de rigidez arterial, HVI y/o enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de HVI.

20 9.1 EJEMPLO 1. TRATAMIENTO DE ERC-TMO CON UN LIGANDO TRAMPA PARA EL RECEPTOR DE ACTIVINA DE TIPO 2A

La ERC-TMO puede incluir calcificación vascular, una osteodistrofia y estimulación de la secreción de FGF23 por los osteocitos esqueléticos en su inicio, e hiperfosfatemia, se desarrolla más tarde en el transcurso para estimular aún más la calcificación vascular. Este ejemplo demuestra que la inhibición de la señalización de ActRIIA, un miembro de la 25 superfamilia de TGF β que señala a través del receptor de activina de tipo IIA (ActRIIA), inducida por la ERC inhibe la calcificación vascular y previene la hipertrofia cardíaca.

9.1.1 MÉTODOS

30 Se indujo ERC con hiperfosfatemia y reducción del 60% de la FG (ERC-3) a las 14 semanas de edad en un modelo de calcificación vascular en ratones *ldlr*^{-/-} con diabetes tipo 2, alimentados con dieta hiperlipídica. Algunos ratones con ERC fueron tratados con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc, inyectada IP semanalmente a partir de las 22 semanas de edad, y se estudiaron a las 28 semanas. Se midieron los niveles aórticos de Ca $^{2+}$, la expresión de proteínas osteoblásticas y de músculo liso vascular, la histomorfometría esquelética y las imágenes de microTC, las químicas séricas y los niveles de FGF23 y PTH. Los niveles de activina, folistatina e inhibina se midieron mediante ELISA, RT-PCR y transferencias Western.

9.1.2 RESULTADOS

40 Los niveles circulantes de activina aumentaron en dos modelos diferentes de enfermedad renal: fibrosis intersticial y Alport ligada al cromosoma X (Fig. 1A y Fig. 1B). Además, los niveles de ARNm de activina A aumentaron en la aorta y el riñón de un modelo de ERC (Fig. 2). Los niveles de activina aumentaron en la vasculatura y la circulación sin cambios en la folistatina (Figura 2A, Figura 2B y Figura 2C). La ERC estimuló la calcificación vascular, que se redujo por debajo de los niveles de la semana 22 mediante el tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) (mActRIIA-Fc; véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.173.601) (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D, Fig. 5A y Fig. 5B), y se evitó la hipertrofia cardíaca. La ERC indujo la expresión de mensajero de Runx2 aórtico, Osterix y Alp y proteína, y estos fueron invertidos por el tratamiento con una trampa de ligando del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc (Fig. 4A y Fig. 4B para ARNm de Runx2 y Alp, respectivamente; Fig. 4F para la proteína Runx2). La ERC redujo el mensajero y la proteína de Klotho y Sm22-alfa, y el tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc normalizó la expresión de Klotho y Sm22-alfa (Fig. 4C y Fig. 4E para ARNm de Klotho y Sm22-alfa, respectivamente; Fig. 4F para proteína). Además, la ERC redujo el mensajero de MYOCD (Fig. 4D). Además, la ERC redujo la proteína alfa-actina de músculo liso (actina alfa-músculo liso) (Fig. 6A). Además, la ERC estimuló niveles elevados de calcio que fueron reducidos por el tratamiento con mActRIIA-Fc (Fig. 6A). El volumen óseo aumentó mediante el tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc, y la superficie de la fosa de osteoclastos disminuyó, pero las tasas de formación ósea y las superficies de los osteoblastos no se vieron afectadas (Fig. 6B, Fig. 6C y Fig. 6D). No se modificaron la hiperfosfatemia y los niveles de FGF23 mediante el tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc.

60 El tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc inhibió la resorción ósea y aumentó el volumen óseo. El tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) mActRIIA-Fc inhibió la señalización dependiente de Smad, bloqueó la transición osteoblástica aórtica, aumentó los niveles de proteína de músculo liso vascular y disminuyó la calcificación vascular estimulada por la ERC y la hipertrofia cardíaca.

65 9.2 EJEMPLO 2. LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC) ESTIMULA LA TRANSICIÓN ENDOTELIAL A MESENQUIMATOSA (ENMT) AÓRTICA QUE CAUSA CALCIFICACIÓN VASCULAR Y ES INHIBIDA POR UN LIGANDO TRAMPA DE ACTIVINA

El mecanismo molecular que subyace a la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica no se conoce del todo. Sin embargo, los niveles de activina aumentan en la calcificación vascular estimulada por la ERC. Para evaluar el papel de las activinas en la calcificación vascular estimulada por la ERC, se usó una proteína de fusión recombinante que se une a una serie de ligandos de la superfamilia de TGF-beta en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica en un modelo de aterosclerosis y diabetes de tipo 2. La proteína de fusión ActRIIA-Fc consiste en el dominio extracelular del receptor de activina IIA (ActRIIA) unido a un dominio Fc de inmunoglobulina 1 (IgG1) y la proteína actúa como ligando trampa para miembros de la familia TGF-beta como la activina A, la activina B, el factor de diferenciación del crecimiento-11 (GDF11) y la proteína morfogenética ósea-10 (BMP-10).

Se ha mostrado previamente que las enfermedades renales causan calcificación vascular al producir una inhibición sistémica de Wnt durante la reparación renal. Este ejemplo demuestra que los efectos vasculares de la inhibición de Wnt estimulada por la ERC son la estimulación de la activina vascular, así como la inducción de la EnMT dependiente de Smad, y que un ligando trampa del receptor de activina, inhibe la EnMT y la calcificación vascular.

9.2.1 MÉTODOS

Se indujo ERC con inhibidores de Wnt elevados en los modelos de ratón para el rastreo de linajes y la calcificación vascular. Los niveles de activina, folistatina e inhibina se midieron mediante ELISA, RT-PCR y transferencias Western. El rastreo del linaje celular se realizó en ratones GNZ (Stoller et al, Genesis, 2008) cruzados con ratones Tie2-Cre específicos del endotelio. Los ratones con GNZ insertado expresan GFP nuclear y lacZ tras la recombinación mediada por Cre.

9.2.2 RESULTADOS

Los niveles de activina aumentaron en la vasculatura y la circulación sin cambios en los niveles de folistatina en modelos de ratón de enfermedad renal y calcificación vascular estimulada por ERC. La ERC indujo la expresión de GFP y lacZ en las células de la adventicia y la túnica media de GNZ; ratones Tie2-Cre con ERC en comparación con los ratones GNZ; ratones Tie2-Cre con función renal normal en donde GFP y lacZ se limitaban al endotelio aórtico. Tie2 es un receptor específico del linaje endotelial, y esto demuestra que la ERC induce EnMT aórtica (Fig. 7A, Fig. 7B, Fig. 7C y Fig. 7D). La EnMT aórtica estimulada por la ERC produjo una disminución de la función del músculo liso vascular, transición osteoblástica y calcificación. El tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) (mActRIIA-Fc; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.173.601), inhibió la señalización dependiente de Smad, bloqueó la transición osteoblástica aórtica, aumentó la función muscular lisa vascular y disminuyó la calcificación vascular estimulada por la ERC. Así, la ERC indujo activina vascular y EnMT, y el tratamiento con un ligando trampa del receptor de activina de tipo 2A (mActRIIA) disminuyó la señalización de activina inhibiendo la desdiferenciación vascular, la transición osteoblástica y la calcificación vascular.

9.3 EJEMPLO 3. RESULTADOS INICIALES DE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA CUANTITATIVA CON BÚSQUEDA DE SEÑAL PARA MASA ÓSEA Y CALCIFICACIÓN VASCULAR EN SUJETOS EN HEMODIÁLISIS TRATADOS CON DOSIS CREcientes

La osteodistrofia renal (ODR) de recambio rápido se caracteriza por una mayor porosidad cortical, una mayor masa de hueso trabecular y un mayor riesgo de fractura. ActRHA-Fc, un ligando trampa de proteína de fusión de activina A RIIA-IgG1 en estudio para la corrección de la anemia en sujetos en hemodiálisis (HD), bloquea la señalización de la activina A y puede reducir la osteoclastogénesis y promover la maduración de los osteoblastos en el hueso. El presente análisis en sujetos en HD evaluó el efecto de ActRIIA-Fc sobre la densidad mineral ósea (DMO) y la calcificación vascular usando tomografía computarizada cuantitativa (TCc).

9.3.1 MÉTODOS

Los sujetos en hemodiálisis tratados con un inhibidor de la señalización de ActRIIA que respondían al agente estimulante de la eritropoyetina (AEE) fueron lavados del efecto del AEE hasta que la hemoglobina (Hb) fue <10 g/dl, y luego se aleatorizaron a tratamiento con un inhibidor de la señalización de ActRIIA a las siguientes dosis: 0,3 mg/kg (n=9), 0,5 mg/kg (n=8), 0,7 mg/kg (n=6), o placebo (PBO; n=7) por vía subcutánea cada 28 días durante un máximo de 8 ciclos de dosis. Se evaluó a los sujetos para los efectos sobre la Hb, la densidad mineral ósea (DMO) y los biomarcadores del recambio óseo. Los fracasos del tratamiento (Hb <9 g/dl) se corrigieron con AEE y/o transfusión de glóbulos rojos. Se realizaron tomografías computarizadas cuantitativas (TCc) de la cadera y la columna lumbar en el nivel basal y después de la fase de tratamiento de 225 días. Los biomarcadores, BSAP y CTX, se midieron al inicio y después de los ciclos de dosis 3, 5 y 7.

Se obtuvieron TCc de la cadera, la columna lumbar y la aorta abdominal en el nivel basal y después de la fase de tratamiento de 225 días. Los sujetos se colocaron en decúbito supino sobre un modelo de calibración Mindways (Modelo 3; Mindways Software, Inc., Austin, TX). El grosor de corte de 2,5 mm y la matriz de 512 × 512 se reconstruyeron usando un núcleo estándar de tejido blando. Se usó el programa informático de análisis Mindways (versión 5.0.3) para evaluar la DMO volumétrica (DMOV). Se determinó la DMOV trabecular (mg/cm³) para 2 vértebras dentro de L1-4 (normalmente L1-

2). Se analizaron los fémures proximales izquierdos para DMOv de los compartimentos óseos cortical, trabecular e integral de la cadera total, el cuello femoral y las regiones trocantéricas.

5 La calcificación vascular de la aorta abdominal se evaluó usando un programa informático que segmenta de forma semiautomática el área y el volumen de las calcificaciones en la región adyacente a la parte superior de L1 hasta la parte inferior de L4. El número y la ubicación de los cortes se mantuvieron en todas las visitas por sujeto. Las puntuaciones de Agatston y volumétricas transformadas de la raíz cuadrada se determinaron como se describe en Agatston et al., J Am Coll Cardiol. 1990; 15:827-832 y Hokanson et al., AJR AM J Roentgenol. 2004;182:1327-1332. Menores puntuaciones totales de Agatston y del volumen total transformado de la raíz cuadrada (mm³) indican niveles más bajos de calcificación vascular (CV).

10

Todo el control de calidad de las imágenes y los análisis ciegos se realizan de forma centralizada por PAREXEL imaging (PAREXEL International Corp. Waltham, MA).

15 Los biomarcadores, incluida la fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP), el propéptido aminoterminal del procolágeno de tipo 1 (P1NP) y el telopeptido carboxiterminal del colágeno de tipo 1 (CTX) se midieron en el nivel basal y tras los ciclos de dosis 1, 3, 5 y 7.

9.3.2 RESULTADOS

20 Se aleatorizó un total de 31 sujetos y recibieron más de una dosis de la medicación del estudio.

Tabla 2. Sujetos aleatorizados y subconjunto de análisis de TCc

Sujetos, n	ActRIIA-Fc			
	Placebo	0,3 mg/kg	0,5 mg/kg	0,7 mg/kg
Aleatorizados y que recibieron ≥1 dosis de la medicación del estudio	8	9	8	6
Medidas de TCc en el nivel basal y en el día 225	3	6	5	2

25 La disposición de los sujetos se describe en la Fig. 8, incluyendo los sujetos con mediciones de TCc emparejadas en el nivel basal y en el día 225.

30 La mayoría de los sujetos interrumpieron el tratamiento del estudio después de un fracaso terapéutico que requirió rescate (generalmente debido a una Hb <9 g/dl); ningún sujeto interrumpió el tratamiento debido a un acontecimiento adverso (EA).

35 De los 16 sujetos con mediciones de TCc emparejadas, 9 requirieron terapia de rescate durante la fase de tratamiento, 8 de los cuales requirieron rescate dentro de los 3 primeros ciclos de dosis.

40 Entre los sujetos con mediciones de TCc emparejadas, las características demográficas y clínicas basales fueron en general similares en todos los grupos de tratamiento (Tabla 3); sin embargo, hubo un tiempo sustancialmente mayor en diálisis en el grupo placebo, que también fue el grupo más joven. También hubo diferencias entre los grupos en las puntuaciones basales de biomarcadores y de Agatston (Tabla 4).

Tabla 3. Características demográficas y clínicas basales de sujetos con mediciones de TCc emparejadas

	Placebo n=3	ActRIIA-Fc		
		0,3 mg/kg n=6	0,5 mg/kg n=5	0,7 mg/kg n=2
Edad, media, años	54,0	57,3	60,8	69,0
Mujeres, n (%)	0 (0,0)	4 (66,7)	0 (0,0)	1 (50,0)
Raza, n (%)				
Blanca	1 (33,0)	3 (50,0)	3 (60,0)	1 (50,0)
Negra	1 (33,0)	3 (50,0)	2 (40,0)	1 (50,0)
Asiática	1 (33,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Etnia, n (%)				
Hispana	0 (0,0)	2 (33,0)	3 (60,0)	1 (50,0)
No hispana	3 (100,0)	4 (66,7)	2 (40,0)	1 (50,0)

	Placebo n=3	ActRIIA-Fc		
		0,3 mg/kg n=6	0,5 mg/kg n=5	0,7 mg/kg n=2
Peso después de la diálisis, media, kg	70,4	80,3	79,4	84,4
Índice de masa corporal, media, kg/m ²	25,4	27,7	26,9	29,2
Diabetes, n (%)	2 (66,7)	5 (83,3)	5 (100,0)	2 (100,0)
Paratiroidectomía, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Tiempo en diálisis, media, meses	101,2	43,3	22,4	11,3
Quelante de fosfato no cárlico, n (%)*	3 (100,0)	3 (50,0)	3 (60,0)	0 (0,0)
Quelante de fosfato a base de calcio, n (%)*	1 (33,3)	4 (66,7)	4 (80,0)	2 (100,0)
Calcimiméticos, n (%)*	1 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Análogo de 1,25-OH vitamina D, n (%)	2 (66,7)	5 (83,3)	2 (40,0)	2 (100,0)

Tabla 4. Biomarcador basal medio, DMO por área y puntuaciones de Agatston de sujetos con mediciones de TCc emparejadas.

	Placebo n=3	ActRIIA-Fc		
		0,3 mg/kg n=6	0,5 mg/kg n=5	0,7 mg/kg n=2
PTH total basal, pg/ml	261,4	104,8	135,5	100,4
BSAP, µg/l	28,3	18,0	13,2	7,5
P1NP, ng/ml	623,7	376,2	468,4	308,0
CTX, pg/ml	3,417,7	2,062,5	2,266,8	1,377,0
DMO integral de cadera total, mg/cm ³	279,4	306,2	268,9	285,4
DMO cortical del cuello femoral, mg/cm ³	653,1	666,9	593,1	566,5
DMO media de la columna vertebral (L1, L2), mg/cm ³	123,1	125,6	149,1	150,6
Puntuación total de Agatston* de CV	8,665,0	9,472,7	3,618,5	823,2

PTH=hormona paratiroidea.

*Las puntuaciones de Agatston más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.

5

La Tabla 5 proporciona el cambio porcentual desde el nivel basal en las mediciones de DMO por área integral de la cadera, cortical de cuello femoral, cortical de cadera y de columna lumbar.

10

Tabla 5. Nivel basal y cambio porcentual respecto al nivel basal de DMO por área integral de la cadera, cortical del cuello femoral y de la columna lumbar

	Placebo n=3	ActRIIA-Fc		
		0,3 mg/kg n=6	0,5 mg/kg n=5	0,7 mg/kg n=2
Integral de la cadera total				
DMO basal, mg/cm ³	279,4	306,2	268,9	285,4
% de cambio desde la DMO basal (n)	-0,2 (3)	2,5 (5)	4,0 (5)	-1,8 (1)
Cortical del cuello femoral				
DMO basal (mg/cm ³)	653,1	666,9	593,1	565,5
% de cambio desde la DMO basal (n)	-0,9 (3)	-1,4 (5)	1,6 (5)	3,0 (1)
Cadera total, cortical				
DMO basal (mg/cm ³)	708,6	668,4	647,3	635,6

Cadera total, cortical				
% de cambio desde la DMO basal (n)	-0,1 (3)	-1,1 (5)	0,5 (5)	2,7 (1)
Columna lumbar media (L1, L2)				
DMO basal (mg/cm ³)	123,1	125,6	149,1	150,6
% de cambio desde la DMO basal (n)	12,6 (3)	8,0 (6)	0,5 (5)	-2,7 (2)

Un aumento del 2% del hueso cortical puede reducir el riesgo de fractura. El tratamiento con inhibidores de la señalización de ACTRIIA se asoció a un aumento dependiente de la dosis en la proporción de sujetos con un aumento mayor o igual al 2% en el hueso cortical del cuello femoral (Tabla 5 y Fig. 9A).

En la ODR de recambio rápido, se midieron aumentos de la masa de hueso trabecular (es decir, el hueso es de peor calidad), mediante la DMO de la columna lumbar, sin una reducción de las tasas de fracturas vertebrales en la ERT en comparación con la población general. El tratamiento con ACTRIIA previno el aumento de la masa de hueso trabecular en la columna lumbar (Tabla 5 y Fig. 9B).

Los cambios desde el nivel basal en las puntuaciones totales de Agatston en la aorta abdominal se proporcionan en la Tabla 6. Las categorías de cambio en la puntuación total de Agatston y en la puntuación del volumen total transformado de la raíz cuadrada se muestran en la Fig. 9 y la Tabla 7.

15

Tabla 6 Nivel basal y cambio desde el nivel basal en la puntuación total de Agatston en la aorta abdominal y en la puntuación del volumen total transformado de la raíz cuadrada

	ActRIIA-Fc			
	Placebo n=3	0,3 mg/kg n=6	0,5 mg/kg n=5	0,7 mg/kg n=2
Puntuación total de Agatston en la aorta abdominal				
Puntuación total de Agatston basal	8,665	9,473	3,619	823
Cambio desde la puntuación total de Agatston basal	1,050,4	8,578,9	225,7	43,4
% de cambio desde la puntuación total de Agatston basal	58,4	24,9	17,3	3,4
Puntuación de volumen total transformado de la raíz cuadrada				
Raíz cuadrada basal del volumen total, mm ³		52,0	46,2	33,1
Cambio desde la raíz cuadrada basal del volumen total, mm ³		4,5	11,1	1,2
				0,4

* Las puntuaciones totales de Agatston y del volumen total transformado de la raíz cuadrada más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.

20

Once sujetos tenían puntuaciones de Agatston basales que se distribuían entre 10 y 10.000. Cinco sujetos pueden considerarse valores atípicos en el nivel basal (valores atípicos bajos: puntuaciones de Agatston de 0,0, 1,1 y 1,4; valores atípicos altos: puntuaciones de Agatston de 21.033 y 44.356). Por lo tanto, las puntuaciones de Agatston se analizaron sin los valores atípicos (Tabla 7 y Fig. 10).

25

Tabla 7 Nivel basal y cambio en la puntuación total de Agatston excluyendo 5 valores atípicos

	ActRIIA-Fc			
	Placebo n=1	0,3 mg/kg n=4	0,5 mg/kg n=4	0,7 mg/kg n=2
Nueva puntuación total de Agatston basal, excluyendo 5 valores atípicos	4,960	3,120	4,523	823
Cambio desde la puntuación total de Agatston basal, excluyendo 5 valores atípicos	2,711,3	287,7	282,0	43,4
% de cambio desde el nivel basal, excluyendo 5 valores atípicos	54,7	9,0	5,0	3,4

	ActRIIA-Fc			
	Placebo n=1	0,3 mg/kg n=4	0,5 mg/kg n=4	0,7 mg/kg n=2
* Las puntuaciones totales de Agatston y del volumen total transformado de la raíz cuadrada más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.				

Los sujetos fueron analizados por duración de la exposición al inhibidor de la señalización de ActRIIA. Los sujetos se analizaron por estado de exposición: Sujetos ActRIIA-Fc que recibieron hasta 3 dosis, independientemente del nivel de dosis (n=6), y sujetos de ActRIIA-Fc que recibieron >3 dosis, independientemente del nivel de dosis (n=7). El grupo placebo (n=3) no sufrió cambios. Aparte del sexo y la puntuación de Agatston, las características basales clave fueron en general similares entre los que recibieron ≤3 dosis de ActRIIA-Fc y los que recibieron >3 dosis (Tabla 8). El efecto de la exposición sobre la CV se mantuvo intacto en todos los sujetos de ActRIIA-Fc (Tabla 9), así como cuando se excluyeron los valores atípicos (Tabla 10).

10

Tabla 8. Características demográficas y clínicas basales de los sujetos, por exposición a ActRIIA-Fc

	ActRIIA-Fc	
	≤3 dosis n=6	>3 dosis n=7
Edad, media, años	59,0	61,7
Mujeres, n (%)	4 (66,7)	1 (14,3)
Raza, n (%)		
Blanca	3 (50,0)	4 (57,1)
Negra	3 (50,0)	3 (42,9)
Asiática	0 (0,0)	0 (0,0)
Índice de masa corporal, media, kg/m ²	25,7	29,3
Diabetes, n (%)	5 (83,3)	7 (100,0)
Tiempo en diálisis, meses	31,3	24,0
Quelante de fosfato a base de calcio, n (%)	4 (66,7)	6 (85,7)
Calcimiméticos, n (%)	1 (16,7)	1 (14,3)
Análogo de 1,25-OH vitamina D, n (%)	4 (66,7)	5 (71,4)
PTH total basal, media, pg/ml	104,5	125,7
BSAP, media, µg/l	19,8	10,0
P1NP, media, ng/ml	432,2	374,6
CTX, media, pg/ml	2,410,3	1,714,4
Puntuación total de Agatston, media	8,350	3,782
Raíz cuadrada del volumen, mm ³	38,2	35,3

Tabla 9. Nivel basal y cambio desde el nivel basal en la puntuación total de Agatston y en la puntuación del volumen total transformado de la raíz cuadrada, por exposición a ActRIIA-Fc

	ActRIIA-Fc	
	≤3 dosis n=6	>3 dosis n=7
Puntuación total de Agatston basal	8,350	3,782
Cambio desde la puntuación total de Agatston basal	8,461,4	274,3
% de cambio desde la puntuación total de Agatston basal	33,7	5,8
Raíz cuadrada basal del volumen total, mm ³	38,2	35,3
Cambio desde la raíz cuadrada basal del volumen total, mm ³	10,6	1,4

	ActRIIA-Fc	
	≤3 dosis n=6	>3 dosis n=7
*Las puntuaciones totales de Agatston y las puntuaciones del volumen total transformado de la raíz cuadrada más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.		

Tabla 10. Nivel basal y cambio desde el nivel basal en la puntuación total de Agatston, excluyendo 5 valores atípicos, por exposición a ActRIIA-Fc

	ActRIIA-Fc	
	≤3 dosis n=3	>3 dosis n=7
Nueva puntuación total de Agatston basal, excluyendo 5 valores atípicos	1,914	3,782
Cambio desde la puntuación total de Agatston basal, excluyendo 5 valores atípicos	148,4	274,3
% de cambio desde el nivel basal, excluyendo 5 valores atípicos	7,5	5,8

*Las puntuaciones totales de Agatston y las puntuaciones del volumen total transformado de la raíz cuadrada más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.

5

Se evaluaron biomarcadores de recambio óseo. El grupo placebo tenía los niveles más altos de PTH, BSAP, P1NP y CTX en el nivel basal (Tabla 4). No se observaron cambios coherentes desde el nivel basal en los niveles de fósforo, PTH, FGF-23 o esclerostina, excepto que la PTH fue más baja en todos los puntos de tiempo que en el nivel basal en el grupo placebo (-15,2 a -100,7 ng/l). Para biomarcadores óseos, no se observaron cambios claros en el cambio porcentual de los marcadores de formación BSAP y P1NP; el cambio porcentual del marcador de resorción CTX se muestra en la Fig. 11. Más sujetos que recibieron 0,5 mg/kg del inhibidor de la señalización de ActRIIA tuvieron disminuciones significativas y persistentes en el marcador de resorción CTX.

10

9.3.3 CONCLUSIONES

15

De los 30 sujetos aleatorizados, 13 tenían evaluaciones de TCc emparejadas (n=3, 6 y 4 para PBO, 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg, respectivamente). Los cambios relativos de la DMO desde el nivel basal para PBO, 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg fueron de -0,9%, -1,4% y +1,9% de la cortical del cuello femoral, y de +12,6%, +8,0% y -1,9% de la columna lumbar, respectivamente. Los cambios en los biomarcadores con 0,5 mg/kg sugieren un efecto antirresortivo beneficioso.

20

Estos datos demuestran un efecto emergente de la dosis con ActRIIA-Fc 0,5 mg/kg, que parece invertir los efectos de la ODR de recambio rápido en el hueso cortical y esponjoso. Los resultados de PBO son los esperados.

25

9.4 EJEMPLO 4. LA ENFERMEDAD RENAL PRODUCIDA POR FACTORES CIRCULANTES DE REPARACIÓN RENAL CAUSA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

30

Las enfermedades renales se asocian a una mortalidad extremadamente elevada, que está relacionada con su producción de enfermedades cardiovasculares (Sarnak, M.J. et al., 2003. Circulation 108:2154-2169). Un estudio auxiliar del proyecto REGARDS en curso demostró que en pacientes que habían sufrido un episodio de las arterias coronarias (isquemia cardíaca o infarto de miocardio no mortal), la incidencia de segundos episodios cardiovasculares durante una mediana de seguimiento de 4 años era del 35% en pacientes con enfermedad renal, en comparación con el 19% en un grupo de alto riesgo (fumadores, diabetes, hipercolesterolemia), y que la incidencia de mortalidad por todas las causas en el grupo de alto riesgo era la mitad que en el grupo de enfermedad renal crónica (ERC) (Baber, U., et al., 2013. Am Heart J 166:373-380). Las causas del aumento del riesgo cardiovascular asociado a las enfermedades renales residen en un síndrome denominado en 2006 enfermedad renal crónica - trastorno mineral óseo (ERC-TMO) (Moe, S., et al., 2006. Kidney Int 69:1945-1953). En la ERC-TMO se han descubierto tres nuevos factores de riesgo cardiovascular (Block, G.A., et al., 1998. Am J Kidney Dis 31:607-617; Blacher, J., et al., 2001. Hypertension 38:938-942; Gutierrez, O.M., et al., 2008. New Engl J Med 359:584-592.), y su estado de factor de riesgo se confirmó en la población general (Dhingra, R., et al., 2007. Arch Intern Med 167:879-885; Matsushita, K., et al., 2014. Journal of the American Society of Nephrology; Dalal, M., et al., 2011. European Journal of Endocrinology 165:797-803). Estos son hiperfosfatemia, calcificación vascular y niveles elevados del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23). La ERC-TMO comienza en las primeras fases de la ERC (estadio 2) (Fang, Y., et al., 2014. Kidney Int 85:142-150; Pereira, R.C., et al., 2009. Bone 45:1161-1168; Fang, Y., et al., 2009. J Am Soc Nephrol 20:36A; Hu, M.C., et al., 2011. J Am Soc Nephrol 22:124-136.) que consiste en la desdiferenciación/calcificación vascular, una osteodistrofia, pérdida de Klotho y aumento de la secreción de FGF23 (Fang, Y., et al., 2014. Kidney Int 85:142-150.), pero si bien se ha avanzado en las causas de la ERC-TMO en la insuficiencia renal precoz (Hu, M.C., et al., 2011. J Am Soc Nephrol 22:124-136; Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763; de Oliveira, R.B., et al., 2013. Nephrology Dialysis Transplantation 28:2510-2517; Sabbagh, Y. 2012. J. Bone Miner. Res. 27:1757-1772.), en su mayoría son desconocidos.

Se ha demostrado que las enfermedades renales reactivan los programas de desarrollo implicados en la nefrogénesis durante la reparación renal estimulada por la enfermedad (Surendran, K., et al., 2002. Am J Physiol Renal Physiol 282:F431-F441; Surendran, K., et al., 2005. J Am Soc Nephrol 16:2373-2384; Maeshima, A., et al., 2001. Cytokine & Growth Factor Reviews 12:289-298; Terada, Y., et al., 2003. Journal of the American Society of Nephrology 14:1223-1233; Kawakami, T., et al., 2013. J Pathol 229:221-231). Entre los factores nefrogénicos reactivados en la reparación renal, la familia Wnt (acrónimo de Wingless e Integrated) es fundamental para la reconstitución epitelial tubular (Terada, Y., et al., 2003. Journal of the American Society of Nephrology 14:1223-1233; Kawakami, T., et al., 2013. J Pathol 229:221-231; Rinkevich, Y., et al., 2014. Cell Reports 7:1270-1283). En el control de la función Wnt, la señalización canónica induce transcripcionalmente la expresión de una familia de proteínas inhibidoras Wnt que son proteínas secretadas que sirven para restringir las distancias de la estimulación Wnt a factores autocrinos o paracrinos (Niida, A., et al., 2004. Oncogene 23:8520-8526; Niehrs, C. 2006. Oncogene 25:7469-7481; Reya, T., et al., 2003. Nature 423:409-414; Chamorro, M.N., et al., 2004. The EMBO Journal 24:73-84; Gonzalez-Sancho, J.M., 2004. Oncogene 24:1098-1103). Los inhibidores de Wnt son factores circulantes, y la familia de inhibidores de Wnt incluye Dickkopfs (Dkk), las proteínas secretadas relacionadas con frizzled (Sfrps), la esclerostina, sostDoc 1, crescent, el factor inhibidor de Wnt 1 (Wif1) e Icat (Niehrs, C. 2006. Oncogene 25:7469-7481). Diversas formas de enfermedad renal aumentan la expresión renal de los inhibidores de Wnt y aumentan sus niveles en la circulación (Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763; Surendran, K., et al., 2005. J Am Soc Nephrol 16:2373-2384).

La neutralización de un inhibidor clave de Wnt elevado en la circulación en la ERC, Dkk1, inhibe la desdiferenciación vascular inducida por la ERC, la calcificación vascular y la osteodistrofia renal (Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763). Este efecto es sorprendente, ya que la señalización de Wnt en el músculo liso vascular está implicada en la estimulación de la transición osteoblástica y la calcificación vascular (Al-Aly, Z., et al., 2007. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:2589-2596; Shao, J.S., et al., 2005. Journal of Clinical Investigation 115:1210-1220). Sin embargo, estudios recientes demuestran que la inhibición de Wnt7b aórtico mediada por Dkk1 estimula la transición endotelial-mesenquimatosa (EnMT) aórtica mediada por Smad y la calcificación vascular (Cheng, S.-L., et al., 2013. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 33:1679-1689). La EnMT es un proceso fisiológico del desarrollo implicado en el desarrollo de las válvulas cardíacas, el tabique cardíaco y la raíz aórtica (Eisenberg, L.M., y Markwald, R.R. 1995. Circulation Research 77:1-6; Camenisch, T.D., et al., 2002. Developmental Biology 248:170-181.) y puede (Zeisberg, E.M., et al., 2007. Nat Med 13:952-961.) o no puede (Moore-Morris, T., et al., 2014. The Journal of Clinical Investigation 124:2921-2934) contribuir a la fibrosis cardíaca en diversos estados de enfermedad del adulto. Este factor investiga si otros factores implicados en el intento de reparación renal durante la enfermedad renal derivan de la superfamilia de TGF β y aumentan en la circulación durante la ERC.

35 9.4.1 MÉTODOS

9.4.1.1 Producción de modelos animales

40 Se adquirieron machos ateroscleróticos deficientes en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*ldlr*^{-/-}) (acervo C57B1/6J) de Jackson Laboratories y alimentarse con una dieta hiperlipídica (42% de calorías procedentes de grasa) (Teklad #) a partir de las 12 semanas de edad. Los ratones son obesos, resistentes a la insulina a las 22 semanas de edad, diabéticos a las 28 semanas de edad e hipercolesterolemicos.

45 Se utilizó un procedimiento de dos etapas para crear una enfermedad renal crónica, como se ha descrito anteriormente (Davies, M.R., et al., 2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567; Davies, M.R., et al., 2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928). Se aplicó electrocauterio al riñón derecho a través de una incisión de 2 cm en el flanco a las 12 semanas postnatales, seguido de una nefrectomía total izquierda a las 14 semanas de edad. La intensidad del cauterio se varió para producir una lesión renal moderada (ERC-3) que se confirmó mediante aclaramientos de inulina a las 20 semanas de edad (Fig. 12A). Los animales de control se sometieron a operaciones simuladas en las que se expuso y movilizó el riñón apropiado, pero no se trató de ninguna otra forma. En este estudio se usaron cinco grupos de ratones (Fig. 15B). El primer grupo era ratones C57B1/6J naturales alimentados con una dieta de comida normal (WT). Este fue el grupo de función renal y dieta normales usado para los valores de control normativos. El segundo grupo era ratones *ldlr*^{-/-} que se alimentaron con una dieta hiperlipídica y se sometieron a una operación simulada (Simulación). Este grupo tenía función renal y sirvió como grupo de control para determinar el efecto de la enfermedad renal. El tercer grupo era ratones *ldlr*^{-/-} con una FG reducida equivalente al estadio 3 de la ERC humana alimentados con una dieta hiperlipídica (ERC-3) con eutanasia a las 22 semanas, el grupo de calcificación vascular basal (ERC-3). El cuarto grupo era ratones *ldlr*^{-/-} con ERC-3 que reciben inyecciones subcutáneas de vehículo dos veces por semana a partir de las 22 semanas hasta la eutanasia a las 28 semanas (ERC-3 V). El quinto grupo era ratones *ldlr*^{-/-} con ERC-3 que reciben inyecciones subcutáneas de mActRIIA-Fc (Celgene, Summit, NJ), 10 mg/kg dos veces por semana a partir de las 22 semanas hasta la eutanasia a las 28 semanas (ERC-3 mActRIIA-Fc).

60 El segundo modelo de ERC usado era el homólogo murino del síndrome de Alport ligado al cromosoma X, que es una deficiencia en el gen de la cadena a5 del colágeno de tipo IV, COL4A5 (Rheault, M.N., et al., 2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474). Se trata de un modelo de enfermedad renal espontánea, y se usó a lo largo de los resultados para confirmar los efectos de la ERC inducida por ablación renal. Se adquirieron parejas reproductoras de

Jackson Laboratories y se criaron para experimentos. Los machos hemicigotos desarrollaron espontáneamente una enfermedad renal comparable a la ERC humana en estadio 3-4 a los 200 días del nacimiento.

El tercer modelo de ERC usado fue la ablación renal, similar al protocolo *Idlr*-/-, en una línea de ratón transgénico usada para el rastreo del linaje celular, el ratón GNZ. (Fig. 14). Se adquirieron ratones hembra indicadores GNZ (Stoller, J.Z., et al., 2008. *Genesis* (New York, N.Y. 2000) 46:200-204.) y el ratón macho transgénico Tek-Cre (Koni, P.A., et al., 2001. *The Journal of Experimental Medicine* 193:741-754.) se adquirieron de Jackson Laboratories y se criaron para producir ratones GNZ / Tek-Cre + para experimentos. Los compañeros de camada GNZ/ Tek-Cre - sirvieron como controles negativos. El genotipado de los ratones se realizó usando cebadores específicos recomendados por el fabricante para las razas de ratones GNZ y Tek-Cre. En todos los casos, la eutanasia se realizó bajo anestesia. Se usó anestesia intraperitoneal (xilazina 13 mg/kg y ketamina 87 mg/kg) para todos los procedimientos. Se tomaron muestras de sangre de la vena safena 1 semana después de la segunda cirugía para evaluar la función renal posquirúrgica basal. En el momento del sacrificio, se extrajo sangre por punción intracardíaca y se diseccionaron en bloque el corazón y la aorta.

9.4.1.2 Aclaramientos de inulina

Los aclaramientos de inulina a las 20 semanas o a las 26 semanas, si la eutanasia fue a las 28 semanas, se realizaron según las instrucciones del fabricante (BioPal Inc., Worcester, MA).

9.4.1.3 Cuantificación de la calcificación química

Se diseccionaron la aorta y el corazón en el momento del sacrificio y se eliminó todo el tejido extraño mediante disección roma bajo un microscopio de disección. Los tejidos se desecaron durante 20-24 horas a 60 °C, se pesaron y se trituraron con un mortero y mano de mortero hasta convertirlos en polvo. El calcio se eluyó en HCl 1 N durante 24 horas a 4 °C. El contenido de calcio del eluido se analizó mediante el método de la complexona de cresolftaleína (Sigma, St Louis), según las instrucciones del fabricante, y los resultados se corrigieron para el peso seco del tejido.

9.4.1.4 Análisis de sangre

El suero se analizó el día de la extracción de sangre para nitrógeno ureico en sangre (BUN), calcio y fosfato mediante métodos de laboratorio en autoanalizadores estándar. Los niveles plasmáticos de activina (Fitzgerald Industries, Acton, MA), folistatina (MYBIOSOURCE Inc., San Diego, CA) y 3 similar a la folistatina (MYBIOSOURCE Inc.) se determinaron en ensayos de ELISA. Los niveles séricos de Dkk1 se analizaron con un ELISA (R&D Systems, Minn., MN). Para los ensayos ELISA, se extrajo sangre por vena safena o punción cardíaca en el momento de la eutanasia. Todas las muestras de sangre se colocaron en hielo en el momento de la extracción. Las muestras de plasma EDTA pobre en plaquetas se hicieron mediante una centrifugación de 2 etapas a 6000 rpm durante 5 minutos y 14000 rpm durante 2 minutos, ambos a 4 °C. Las muestras se almacenaron congeladas a -20 °C o menos hasta su uso.

9.4.1.5 Histología e inmunohistoquímica

Los tejidos aórticos, renales y cardíacos se fijaron en formol tamponado neutro al 10% durante toda la noche, después se transfirieron a etanol al 70% a 4 °C, se incorporaron en parafina y se prepararon secciones de 5 micras. Los portaobjetos se desparafinaron en xileno, se deshidrataron en una serie graduada de etanol y se volvieron a hidratar. Se usó tinción tricrómica de Masson para detectar la fibrosis renal y cardíaca y la tinción con rojo de alizarina se usó para detectar la calcificación, según un protocolo estándar (Gregory, C.A., et al., 2004. *Analytical Biochemistry* 329:77-84). Para la tinción inmunohistoquímica, la peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O al 3% en metanol durante 15 minutos. La unión no específica se bloqueó con agentes bloqueantes de avidina y biotina (Vector laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) durante 30 min, después con suero de burro normal al 3% durante 20 min. Después del lavado con PBS, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche, y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante una hora, después se realizó la tinción con peroxidasa conjugada con estreptavidina usando el kit DAB (SK-4100, Vector Laboratories). Para la tinción inmunofluorescente doble, las secciones se bloquearon en suero de cabra al 20% y se tiñeron secuencialmente con los primeros anticuerpos primarios y secundarios y con los segundos anticuerpos primarios y secundarios usando anticuerpos secundarios Alexa 488 y Alexa 568 de cabra anti-conejo 1:400 (Life Technologies, A11008 y A11011) o el kit TSA (Life Technologies, T 20932) para la amplificación de la señal según las instrucciones del fabricante. Cuando se usaron anticuerpos primarios de la misma especie para la doble tinción, los portaobjetos se calentaron 5 min en tampón citrato en microondas antes de la segunda tinción (Toth y Mezey, 2007). En este estudio se usaron anticuerpos primarios para la inmunotinción: anticuerpo policlonal de conejo anti-ActRIIA 1:250 (Abcam, ab 135634), anticuerpo policlonal de conejo anti-inhibina beta A 1:100 (Santa Cruz, sc-50288), anticuerpo policlonal de conejo anti-CD31 1:50 (Abcam, ab28364) y anticuerpos policlonales de conejo anti-GFP 1:1000 (Abcam, ab6556).

9.4.1.6 RT-PCR

El ARN se extrajo de aortas y cultivos celulares usando kits RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA). Se retrotranscribió 1 µg de ARN total tratado con DNase usando el kit de síntesis de ADNc iScript de Bio-Rad (Hercules, Ca) según las instrucciones del fabricante. Los cebadores se diseñaron usando el programa informático Vector NTI (Invitrogen, Grand

Island, NY) o Primer Express. Se usó un ciclador térmico de ADN de Perkin-Elmer para realizar la reacción. Tras la transcripción inversa realizada como anteriormente, se llevó a cabo PCR en tiempo real usando el instrumento de PCR en tiempo real StepOne Plus (AB), SYBR Green de Sigma (St. Louis) y el kit de PCR de Invitrogen. Cada reacción se realizó por triplicado a 95 °C, 45 s y 60 °C, 30 s, y 60 s a 72 °C durante 40 ciclos. Esto fue seguido de un ciclo de fusión, que consistió en un aumento escalonado de la temperatura de 60 °C a 95 °C. Se observó un único pico predominante en la curva de disociación de cada gen, lo que corroboraba la especificidad del producto de la PCR. Los números Ct (valores umbral) se fijaron dentro de la fase exponencial de la PCR y se usaron para calcular los niveles de expresión de los genes de interés. Se usó B2m como patrón interno y se usó para normalizar los valores. Se generó una curva estándar que consistía en Ct frente a diluciones logarítmicas de ADNc (correspondientes al logaritmo del número de copias) amplificando diluciones sucesivas de ADNc correspondientes a una cantidad desconocida de amplicón. Se realizaron controles negativos inactivando la transcriptasa inversa hirviéndola durante 5 minutos antes de la RT-PCR para asegurar que no se amplificaba ADN genómico.

9.4.1.7 Inmunotransferencia (análisis Western)

Se prepararon lisados proteínicos de células enteras de riñón y aorta de los ratones con tampón de lisis RIPA (Thermo Scientific) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Santa Cruz). Los lisados (20 µg) se cargaron en geles de SDS-PAGE al 8-12% y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos contra la inhibina β-A (Santa Cruz), α-tubulina (Santa Cruz), Snai1 (Cell Signaling), alfa-SMA (Sigma), Runx2 (Cell Signaling), MYOCD (Santa Cruz), ACVRL1 (Origene), ACVR1 (Cell Signaling), Erk1/2 (Cell Signaling), fosfo-Erk1/2 (Cell Signaling), ACVR1B (Origene), col1a1 (Santa Cruz), Smad2/3 (Cell Signaling), o fosfo-Smad2/3 (Cell Signaling). En el ensayo de inmunoprecipitación (IP), se usó la misma proteína de lisado de células enteras. Para reducir la unión inespecífica, las muestras se limpian previamente usando perlas de agarosa de proteína A prelavadas (Cell Signaling). Las muestras previamente limpiadas se incubaron durante la noche con el anticuerpo fosfo-serina (Abcam). A continuación, los complejos IP-anticuerpo se capturaron en perlas de agarosa de proteína A y las proteínas se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia.

9.4.1.8 Estudios en humanos

Los sujetos se inscribieron tras dar su consentimiento informado según las directrices de la Declaración de Helsinki. Los sujetos reunían las condiciones si eran mayores de 18 años y tenían ERC en estadio 3 (FG estimada de 30-59 ml/min/1,73m² usando la ecuación del estudio Modification of Diet in Renal Disease (Levey, A.S., et al., 1999. Ann Intern Med 130:461-470). Los criterios de exclusión incluían embarazo, enfermedad ósea, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, disfunción diastólica o hipertensión grave. Los miembros del equipo de investigación identificaron a los pacientes de su clínica que cumplían los criterios de inclusión y estaban interesados en el estudio. Se revisaron los historiales médicos para determinar la elegibilidad final antes de la inscripción. Se obtuvieron muestras de sangre de cada sujeto en la visita basal y después de 12 meses de tratamiento. Hubo variación interindividual en la hora del día en que se obtuvieron las muestras de sangre. Se obtuvieron alícuotas de plasma de cada muestra y se usaron inmediatamente para las pruebas bioquímicas o se congelaron a 80 °C. Los niveles plasmáticos de activina se midieron por duplicado usando kits ELISA disponibles en el mercado, según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

9.4.1.9 Estadística

Se realizó el análisis estadístico usando ANOVA. Todos los datos se expresan como media ± DE, a menos que se especifique otra cosa en la leyenda de la figura. Las diferencias entre grupos se evaluaron *a posteriori* usando el método LSD de Fisher y se consideraron significativas a p <0,05. Los análisis se realizaron usando el programa estadístico Sigma Stat (Point Richmond, CA). Los datos de todos los grupos representan una "n" de 7-15. Para el análisis de PCR en tiempo real se usó un mínimo de 3 muestras en cada grupo experimental. Se usaron pruebas de la t para datos independientes para comparar ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc frente a ratones con ERC-3 V tratados con vehículo o ratones con operación simulada (simulación). En la Fig. 6, los recuadros representan la mediana y los intervalos intercuartílicos (del percentil 25 a 75), y las barras de error presentan 1,5 veces el intervalo intercuartílico por debajo del percentil 25 y por encima del 75. Las medias se compararon usando el método de ANOVA de Holm-Sidak para comparaciones múltiples con p<0,05 como nivel crítico de diferencia significativa.

9.4.2 RESULTADOS

9.4.2.1 Función renal en modelos de ERC

Se indujo ERC análoga a la ERC humana en estadio 3 (ERC-3) en tres modelos experimentales. El primer modelo fue un modelo de calcificación vascular aterosclerótica estimulada por la ERC: el ratón *ldlr*-/- alimentado con dieta hiperlipídica (Fang, Y., et al., 2014. Kidney Int 85:142-150; Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763; Davies, M.R., et al., 2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567; Davies, M.R., et al., 2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928; Lund, R.J., et al., 2004. J Am Soc Nephrol 15:359-369; Mathew, S., et al., 2008. J Am Soc Nephrol 19:1092-1105. PMCID:PMC2396927; Mathew, S., et al., 2007. J Am Soc Nephrol 18:122-130; Mathew, S., et al., 2008. J Am Soc Nephrol 19:1509-1519. PMCID:PMC2488263). La función renal medida por el aclaramiento de inulina y por los niveles de BUN se redujo al nivel de la ERC humana de estadio 3 en ratones *ldlr*-/- alimentados con dieta hiperlipídica, como se describe en la Sección 9.4.1.1, y estos ratones se denominarán en lo sucesivo ERC-3 (Fig. 12A y Fig. 12B). Además, los ratones con ERC-3 eran

5

hiperfosfatémicos (Tabla 11), que es coherente con la ERC humana de estadio 3b-4. Un segundo modelo de ERC fue la ERC espontánea que se desarrolla en ratones y humanos deficientes en la cadena a5 del colágeno de tipo IV (Col4a5) (síndrome de Alport) (Rheault, M.N., et al., 2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474). Los ratones deficientes en Col4a5 a los 200 días de edad presentan reducciones en el aclaramiento de inulina y elevaciones de BUN equivalentes a ERC humana de estadio 3-4 (Fig. 12C y Fig. 12D). Un tercer modelo, la ERC-3 en el ratón GNZ se describe en la Sección 9.4.1.1 y a continuación.

Tabla 11. Parámetros bioquímicos séricos en los distintos grupos de animales.

Parámetro	Grupo 1 Natural	Grupo 2 Simulación	Grupo 3 ERC-3	Grupo 4 ERC-3	Grupo 5 ERC-3
Raza	C57/BJ6	<i>ldlr</i> -/-	<i>ldlr</i> -/-	<i>ldlr</i> -/-	<i>ldlr</i> -/-
Dieta	Comida	Hiperlipídica	Hiperlipídica	Hiperlipídica	Hiperlipídica
Cirugía	Ninguno	Simulación	ECR	ECR	ECR
Semanas posnatales	28	28	28	28	28
Tratamiento	Ninguno	Ninguno	Vehículo	mActRIIA-Fc	LaC03
N	12	15	14	15	12
BUN (mg/dl)	24,0 ± 4,6	20,6 ± 3,7	37,7 ± 7,6	36,5 ± 5,8	35,6 ± 9,1
Ca (mg/dl)	8,3 ± 1,8	8,9 ± 0,9	9,4 ± 0,8	8,8 ± 0,3	8,8 ± 1,4
Fósforo (mg/dl)	8,9 ± 0,2	7,9 ± 2,3	11,0 ± 1,6	11,8 ± 1,2	10,5 ± 2,1

10

9.4.2.2 Niveles de activina y receptor aórtico de activina de tipo IIA (ActRIIA)

15

20

25

Se investigó la capacidad de la reparación renal en la ERC para estimular los niveles circulantes de un miembro de la superfamilia de TGFβ. Los niveles circulantes de activina aumentaron en los modelos de ERC (Fig. 13A y Fig. 13B). Se analizaron tejidos renales y aórticos para el ARNm de activina A (un homodímero de inhibina betaA (Inhba)). El ARNm de Inhba fue inducido por la ERC en el riñón y la aorta (Fig. 13C), y los niveles de proteína aumentaron en el riñón (Fig. 13D). Se analizaron aortas de ratones con ERC-3 para la inducción de receptores de tipo II de la superfamilia de TGFβ, que son el componente de unión al ligando de los heteromúltimeros de receptores de la superfamilia compuestos por receptores de tipo II y tipo I (ALK). La ERC-3 producida en el ratón *ldlr* -/- alimentado con dieta hiperlipídica indujo una regulación al alza del receptor A de activina de tipo II (ActRIIA) en el músculo liso vascular aórtico (Fig. 13E). Las activinas se asocian con factores inhibidores regulados, la folistatina y 3 similar a la folistatina (fstL3) (Welt, C., et al., 2002. Experimental Biology and Medicine 227:724-752.), cuyos niveles circulantes (Fig. 13F y Fig. 13G) y tisulares no se vieron afectados por la ERC-3. La estequiometría de folistatina, fstL3 e inhibina (suma de 620 pg/ml más 400 pg/ml de inhibina no medida (Sharpe, R.M., et al., 1999. Journal of Andrology 20:94-101)) a los niveles de activina A (>5000 pg/ml) en la circulación indica que la ERC produce niveles significativos de activina libre, un evento patológico que hace de la activina A un factor circulante en la ERC.

9.4.2.3 Transición endotelial-mesenquimatosa aórtica en la ERC

30

35

40

45

Para estos estudios se utilizó un tercer modelo experimental de ERC. El ratón GNZ se usa para el rastreo del linaje celular (Stoller, J.Z., et al., 2008. Genesis (New York, N.Y. : 2000) 46:200-204.), y los ratones GNZ expresan proteína verde fluorescente y beta galactosidasa (GFP/LacZ) localizadas en el núcleo una vez que se elimina una secuencia STOP flanqueada por *loxP* aguas arriba (Fig. 14A). Para eliminar los sitios *loxP* en los ratones GNZ, se cruzaron con ratones Tek-Cre que expresaban la recombinasa Cre bajo la dirección del promotor/ potenciador de la tirosina cinasa Tek (Tie2). Dado que Tie2 es un receptor de angiopoyetina específico del linaje endotelial, los ratones GNZ/Tek-Cre+ expresan GFP nuclear y citoplasmática en células del linaje endotelial (Fig. 14A) (Moore-Morris, T., et al., 2014. The Journal of Clinical Investigation 124:2921-2934). En los ratones GNZ/Tek-Cre+, la GFP aórtica colocalizada con la tinción nuclear DAPI se limita a las células endoteliales marcadas con el biomarcador CD31 (Fig. 14B, ver las flechas). Cuando ERC-3 se produjo en ratones GNZ/Tek-Cre+, además de las células endoteliales, las células en la túnica media aórtica y la adventicia demostraron tinción GFP, mostrando que estas células derivaban de un linaje endotelial a través de la transición endotelial-mesenquimatosa (EnMT) (Fig. 14C, 14D, ver las flechas). Para analizar con más detalle si la ERC estimula la EnMT, se examinó la expresión de un factor de transcripción implicado en la EnMT, Snai1, en un modelo de ERC espontánea, el ratón con síndrome de Alports. Snai1 se reguló al alza al principio (a los 75 doa) en el curso de la ERC (Fig. 14E), coherente con el momento de niveles máximos de activina (véase más adelante).

9.4.2.4 Efectos vasculares de la inhibición de la señalización de ActRIIA en la ERC

Se utilizó un ligando trampa (Fig. 23A) compuesto por el dominio extracelular de ActRIIA fusionado con el dominio Fc de IgG1 (denominado en lo sucesivo mActRIIA-Fc). La Figura 23B representa el diseño experimental para la utilización de

mActRIIA-Fc en un modelo de calcificación vascular usando un protocolo de tratamiento que permitió que la calcificación vascular estimulada por ERC-3 se desarrollara durante ocho semanas antes de establecer mActRIIA-Fc. Usando este protocolo, el tratamiento de ratones con ERC-3 con el ligando trampa de ActRIIA disminuyó la expresión de Runx2 aórtica estimulada por ERC-3 y la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) aórtica en los ratones con ERC-3 alimentados con dieta hiperlipídica *ldlr*^{-/-} (Fig. 25A). Tanto la expresión de Runx2 como la de ALP representan posibles efectos aguas abajo de la señalización de ActRIIA y biomarcadores de la transición osteoblástica en la aorta que se invirtió por el tratamiento con mActRIIA-Fc. El músculo liso aórtico 22a (Sm22-alfa), un biomarcador de las células musculares lisas vasculares diferenciadas, se redujo con ERC-3 y se estimuló con mActRIIA-Fc. La ERC-3 provocó una disminución de la expresión de miocardina aórtica (MYOCD), el factor de transcripción específico de las células musculares lisas vasculares, pero la miocardina no se vio afectada por el tratamiento con mActRIIA-Fc. La expresión aórtica de Klotho, que se ha relacionado con la calcificación vascular (Lim, K., et al., 2012. Circulation 125:2243-2255.), fue muy baja en comparación con la renal (datos no mostrados). En términos de los efectos de ERC-3 y el tratamiento con mActRIIA-Fc en los niveles proteínicos aórticos de los ARNm de la Figura 25A, la ERC aumentó los niveles aórticos de Runx2 y mActRIIA-Fc normalizó los niveles aórticos de Runx2 (Fig. 25B). La ERC redujo los niveles aórticos de actina de músculo liso alfa (aSMA), otro biomarcador de células musculares lisas vasculares diferenciadas, y el tratamiento con mActRIIA-Fc aumentó los niveles aórticos de aSMA (Fig. 25B). Los niveles de miocardina no cambiaron por la ERC o el tratamiento con mActRIIA-Fc.

9.4.2.5 Efectos de la disminución de la señalización de ActRIIA en la calcificación vascular

La estimulación de la calcificación vascular por la ERC se estudió en un modelo de aterosclerosis y diabetes de tipo 2 (Al-Aly, Z., et al., 2007. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:2589-2596; Towler, D.A., et al., 1998. Journal of Biological Chemistry 273:30427-30434.), el ratón *ldlr*^{-/-} alimentado con dieta hiperlipídica y con ERC ablativa, como se ha descrito anteriormente. La ERC-3 provocó la acumulación de depósitos de calcio en los ateromas aórticos de los ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V) (Fig. 15A), que no estaban presentes en los ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 R), y el contenido de calcio en el tejido aórtico se redujo a los niveles observados en los ratones naturales, significativamente por debajo de los presentes en el momento del establecimiento del tratamiento con mActRIIA-Fc, ERC-3 (Fig. 15B).

9.4.2.6 Efectos de la disminución de la señalización de ActRIIA en la enfermedad cardíaca estimulada por ERC

Se estudió la estimulación de la enfermedad cardíaca por la ERC en el modelo de calcificación vascular. Los ratones con ERC-3 V tuvieron un aumento del peso del corazón que se invirtió por el tratamiento con mActRIIA-Fc (Fig. 16A), pero no por el tratamiento con carbonato de lantano (ERC-3 L (Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763.)), y la ERC-3 V indujo una hipertrofia cardíaca leve (Fig. 16B). Sin embargo, aunque no había indicios de fibrosis cardíaca (Fig. 16C), hubo indicios de hipertrofia de miocitos, que se invirtió por el tratamiento con mActRIIA-Fc.

Dado que uno de los mecanismos de asociación de la calcificación vascular y la hipertrofia cardíaca en la ERC es la rigidez de las grandes arterias, la rigidez vascular y la tensión arterial se midieron usando métodos previamente informados (Wagenseil, J.E., et al., 2009. Circulation Research 104:1217-1224; Wagenseil, J.E., et al., 2005. AJP - Heart and Circulatory Physiology 289:H1209-H1217). La ERC-3 en el ratón aterosclerótico *ldlr*^{-/-} alimentado con dieta hiperlipídica no produjo rigidez vascular de las arterias carótidas o de la aorta (Fig. 19A y 19B) ni elevaciones de la tensión arterial (Tabla 12). Además, la neutralización de Dkk1 en ratones con ERC-3 tratados con anticuerpo neutralizante contra Dkk1 (Fang, Y., et al., 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763.) no tuvo efecto sobre la rigidez aórtica en ausencia de aumento de la rigidez.

Tabla 12. Parámetros fisiológicos cardiovasculares de ratones de 28 semanas de edad.

	WT	Simulación	ERC-3 V	ERC-3 Dkk1 mAb
TAS	108,9±1,1	111,9±4,7	100,4±4,6	110,7±4,8
TAD	77,27±1,0	78,56±2,2	69,14±3,1	77,55±3,6
Tensión diferencial	31,63±0,3	33,32±2,5	31,27±2,1	33,1±1,9
Frecuencia cardíaca	547,1±4,7	501,2±17,4	505,6±14,3	558,6±11,2

TAS=tensión arterial sistólica, TAD=tensión arterial diastólica. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media. N=4-6 ratones por grupo.

9.4.2.7 Señalización de ActRIIA en aorta y riñón y fibrosis renal

La transducción canónica de señales por la superfamilia de TGFβ implica la unión del ligando a los receptores de tipo II que activan su actividad de serina/treonina cinasa y que estimulan la asociación y fosforilación de los receptores de tipo I, las cinasas Alk (véase la representación en diagrama en la Fig. 20). La superfamilia de TGFβ utiliza siete cinasas Alk, y Alk4 (ActRIB) es el receptor de tipo I más frecuentemente asociado a la señalización de activina/ActRIIA (Abe Y, et al., 2004. Growth Factors (Chur, Suiza) 22:105-110). En homogeneizados renales del modelo de ratón de ERC-3, la

- fosforilación de Alk4 no estaba aumentada, según estudios anteriores (Antsiferova, M., y Werner, S. 2012. *Journal of Cell Science* 125:3929-3937.) (Fig. 18A). Por el contrario, fosfoSmad2 aumentó por la ERC-3 y disminuyó por mActRIIA-Fc (Fig. 18A), lo que indica un papel de otro receptor de Alk en la señalización renal de activina en ERC. En el riñón enfermo de ERC-3 con nefritis intersticial, col1a1 estaba regulado al alza y mActRIIA-Fc disminuyó los niveles de col1a1 (Fig. 18A), coherente con la disminución de fosfoSmad2 inducida por mActRIIA-Fc. Además, hubo una disminución importante en la expresión renal de Klotho inducida en los ratones con ERC-3 V que fue corregida por mActRIIA-Fc (Fig. 18B). Como resultado, se analizaron los compartimentos renales en los que se expresaba activina en ERC-3 V y se identificó una fuerte expresión en los miofibroblastos peritubulares, pero no en el epitelio.
- En el músculo liso aórtico se detectaron Alk4 y A1k1 (Fig. 18A), pero no Alk5 ni Alk2. Los niveles de Alk4 y Alk1 no se vieron afectados por la ERC-3. Sin embargo, ERC-3 no aumentó los niveles de fosfomad 2/3 aórtico, ni mActRIIA-Fc los disminuyó (Fig. 18A). Sin embargo, el análisis de la señalización de ActRIIA no canónica (Fig. 20) indicó que la cinasa map (fosfoErk1/2) no fue activada por la ERC ni inhibida por mActRIIA-Fc y que los niveles de p38 y JNK en el músculo liso vascular fueron muy bajos. Los niveles de actina 2 aórticos también eran muy bajos y no estaban estimulados por ERC-3. Los niveles de Axin2 son un biomarcador estándar de la señalización canónica de Wnt. Sin embargo, dado que Dkk1 es una diana transcripcional de la señalización canónica de Wnt, se analizaron los niveles de Dkk1 en el riñón y la aorta como biomarcador de la actividad de Wnt, demostrando que el tratamiento con mActRIIA-Fc disminuyó los niveles renales de Dkk1 en los ratones con ERC-3 (Fig. 18C), produciendo reducciones significativas en los niveles plasmáticos de Dkk1 (Fig. 18C). Además, los niveles aórticos de Dkk1 fueron aumentados por ERC-3 e inhibidos por mActRIIA-Fc (Fig. 18C). Esto indicó que la señalización de Wnt del músculo liso renal y vascular y la liberación sistémica de Dkk1 fueron inhibidas por la supresión de activina. En consecuencia, la activina circulante elevada en la ERC señala a través del aumento de ActRIIA vascular activando la señalización Wnt y estimulando la calcificación aterosclerótica.
- #### 9.4.2.8 Traslación de los estudios preclínicos a la fisiopatología humana y a la clínica
- Como se muestra en la Fig. 19, los niveles séricos de activina aumentaron en una cohorte de pacientes con estadio 3 de ERC, en comparación con los controles sanos.
- #### 9.4.3 CONCLUSIONES
- Este ejemplo demuestra que la activina es un segundo factor implicado en la reparación renal que aumenta en la circulación durante la ERC. Sin quedar ligado a teoría, los resultados demuestran que la expresión de activina aumenta en los riñones enfermos, se libera en la circulación y estimula la desdiferenciación del músculo liso vascular aórtico y la transición osteoblástica, a lo que contribuye la transición endotelial a mesenquimatosa, y estos efectos culminan en la calcificación aterosclerótica y la hipertrofia cardíaca estimuladas por la ERC. La ERC aumenta al alza la expresión renal de activina en los miofibroblastos y estimula la progresión de la enfermedad renal mediante el aumento de la fibrosis renal. La inhibición de la señalización de ActRIIA inhibe la transición osteoblástica y la calcificación aterosclerótica en la aorta. La inhibición de la señalización de ActRIIA inhibe la hipertrofia cardíaca y la fibrosis renal. Los efectos del ligando trampa de ActRIIA, mActRIIA-Fc, en el síndrome de ERC-TMO temprano se asemejan a los de un anticuerpo monoclonal contra Dkk1 en la calcificación vascular estimulada por ERC (Fang, Y., et al., 2014. *J Am Soc Nephrol* 25:1760-1763). Estos datos demuestran que la inhibición de la señalización de ActRIIA en el riñón enfermo disminuyó la activación de Wnt y los inhibidores circulantes de Wnt. Además, en el músculo liso vascular, la activina estimula la actividad de Wnt, que es inhibida por mActRIIA-Fc. Así pues, la reactivación de dos factores de desarrollo renal, Wnts y activina, produce inhibidores circulantes de Wnt y activina en la ERC, causando enfermedades vasculares y cardíacas. Esta es la demostración de que las enfermedades renales causan directamente enfermedades cardiovasculares y que la consideración del proceso de enfermedad renal no puede separarse de la reparación renal y la consiguiente estimulación de la enfermedad cardiovascular.
- Además, este ejemplo demuestra que la expresión renal de activina está aumentada en tres modelos de enfermedad renal crónica, produciendo un aumento de activina circulante que supera los niveles de inhibidores de activina en la circulación. La activina circulante estimuló la transducción de señales a través del receptor ActRIIA produciendo desdiferenciación del músculo liso vascular aórtico, transición osteoblástica y calcificación de placas ateroscleróticas. Estos efectos se debieron a la activina circulante, como demuestra la ausencia de aumento de los niveles de proteína activina en la aorta, a pesar de que la ERC indujo un aumento del ARNm de activina en la aorta (Fig. 13B). Sin quedar ligado a teoría, estos datos demuestran que la señalización vascular de activina es estimulada por la ERC a través de la producción de activina endocrina por el riñón.
- Dado que la EnMT es un proceso mediado por Smad (Cooley, B.C., et al., 2014. *Science Translational Medicine* 6:227ra234.), activado por miembros de la superfamilia de TGFβ que incluye TGFβ, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), activinas/inhibinas y factores de crecimiento y diferenciación (GDF) (Piek, E., et al., 1999. *The FASEB Journal* 13:2105-2124.), se analizaron las aortas del modelo de calcificación vascular con ERC-3 para cambios en los niveles de receptores de tipo II de la superfamilia de TGFβ, que son los componentes de unión al ligando de los receptores. El receptor de activina de tipo IIA (ActRIIA) estaba regulado al alza en el músculo liso vascular aórtico. La administración del dominio extracelular de ActRIIA en una proteína de fusión con el dominio Fc de IgG1 como ligando trampa (mActRIIA-Fc) demostró que la inhibición de la señalización de ActRIIA producía la inhibición de la transición osteoblástica en las células musculares lisas aórticas, la estimulación de la expresión génica de las células musculares lisas vasculares y la inversión

de la calcificación aórtica en un modelo aterosclerótico estimulado por la ERC. Además, la ERC estimuló la EnMT en un modelo de ratón de rastreo de linaje. Sin embargo, el lugar principal de la función de la activina parecía ser el músculo liso vascular, donde aumentaba la expresión de ActRIIA.

- 5 La hipertrofia cardíaca, especialmente ventricular izquierda, es muy prevalente en la ERC (Moran, A., et al., 2008. American Journal of Kidney Diseases 52:839-848; Park, M., et al., 2012. Journal of the American Society of Nephrology 23:1725-1734). Además, el modelo de calcificación vascular aterosclerótica se caracterizó por hipertrofia cardíaca (Fig. 16). Sin embargo, la producción de hipertrofia cardíaca en el modelo difiere mecánicamente del paradigma común de la rigidez vascular estimulada por la ERC (Townsend, R.R. 2015. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 24:47-53 10.1097/MNH.0000000000000086; Merx, M.W., et al., 2005. Journal of the American Society of Nephrology 16:3357-3364.), hipertensión y remodelación cardíaca, ya que los ratones ateroscleróticos ERC-3 (ratones diabéticos alimentados con dieta hiperlipídica *ldlr*^{-/-}) no presentaban rigidez vascular ni hipertensión. Dado que mActRIIA-Fc corrigió la hipertrofia cardíaca en ausencia de cambios en los niveles de FGF23 (Fig. 19), es poco probable que la hipertrofia cardíaca en los ratones con ERC-3 se debiera al FGF23 (Faul, C., et al., 2011. J Clin Invest 121:4393-4408).

15 En conclusión, sin quedar ligado a teoría, este ejemplo demuestra un segundo factor implicado en la reparación renal que aumenta en la circulación durante la ERC y causa enfermedades cardiovasculares. Sin quedar ligado a teoría, el ejemplo demuestra que la expresión de activina aumenta en los riñones enfermos, se libera en la circulación y estimula la desdiferenciación del músculo liso vascular aórtico y la transición osteoblástica, a lo que contribuye la transición endotelial 20 a mesenquimatosa, y estos efectos culminan en la calcificación aterosclerótica y la hipertrofia cardíaca estimuladas por la ERC. La ERC aumenta al alza la expresión renal de activina en los miofibroblastos y estimula la progresión de la enfermedad renal mediante el aumento de la fibrosis renal. La inhibición de la señalización de ActRIIA inhibe la transición osteoblástica y la calcificación aterosclerótica en la aorta. La inhibición de la señalización de ActRIIA inhibe la hipertrofia cardíaca y la fibrosis renal. Los efectos del ligando trampa de ActRIIA, mActRIIA-Fc, en el síndrome temprano de ERC- 25 TMO muestran que la inhibición de la señalización de ActRIIA en el riñón enfermo disminuyó la activación de Wnt y los inhibidores de Wnt circulantes. Así pues, sin quedar ligado a teoría, la reactivación de dos factores de desarrollo renal, Wnts y activina, produce inhibidores circulantes de Wnt y activina en la ERC, causando enfermedad vascular y cardíaca; por tanto, la enfermedad renal causa enfermedad cardiovascular.

30 9.5 EJEMPLO 5: LA LESIÓN/REPARACIÓN RENAL ESTIMULA LA ENFERMEDAD VASCULAR MEDIANTE LA INHIBICIÓN SISTÉMICA DE WNT Y ACTIVINA

9.5.1 ANTECEDENTES

35 Los resultados presentados en este ejemplo se refieren a los resultados presentados en el Ejemplo 4 (Sección 9.4).

Las enfermedades renales causan calcificación vascular aterosclerótica al producir la inhibición sistémica de Wnt y la secreción de activina durante la reparación renal. Los efectos vasculares de la enfermedad renal crónica (ERC) son una interacción de la inhibición de Wnt y la modulación inducida por activina de la función del receptor de activina.

40 9.5.2 MÉTODOS

Se indujo ERC con elevados niveles de inhibidores de Wnt, especialmente Dkk1, y activina en modelos de ratón para el rastreo de linajes y la calcificación vascular, y se dejó que se desarrollara espontáneamente en ratones Alport. Se midieron 45 los niveles de activina, Dkk1, receptor de activina de tipo 2A (ActRIIA), fosfoSmad 2/3 y colágeno mediante ELISA, RT-PCR y transferencias Western. Se midió la función del músculo liso vascular mediante dilatación arterial inducida por presión. El rastreo del linaje celular se realizó en ratones Rosa-tdT cruzados con ratones Tie2-Cre específicos del endotelio. Los ratones portadores de Rosa-tdT expresan rojo tomate en células portadoras de recombinasa Cre. mActRIIA-Fc se 50 refiere a un ligando trampa de activina A (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.173.601 y Carrancio et al., 2014, British Journal of Haematology, 165:870-882).

9.5.3 RESULTADOS

La ERC aumentó los niveles circulantes de Dkk1 y activina. En los riñones enfermos, la activina se expresaba en los 55 miofibroblastos y aumentó la señalización de ActRIIA a través de fosfoSmad 3. En los riñones enfermos, mActRIIA-Fc, un ligando trampa de ActRIIA, inhibió fSmad 3 renal, la expresión de col1a1, los niveles de proteína urinaria y los niveles de Dkk1 y aumentó los niveles de Klotho. En la vasculatura, los niveles y la señalización de ActRIIA se vieron afectados por la ERC, junto con una disminución de la diferenciación y la función del músculo liso vascular. En la vasculatura de ratones con ERC, mActRIIA-Fc aumentó la diferenciación de las células musculares lisas vasculares e inhibió la transición osteoblástica y la calcificación vascular. En la circulación, mActRIIA-Fc redujo los niveles de Dkk1. La ERC indujo la expresión de rojo tomate en células de la adventicia de arterias femorales lesionadas de ratones ERC Tek-Cre/Rosa-tdT frente a ratones ERC Tek-Cre/Rosa-tdT con función renal normal, en donde el rojo tomate se limitó al endotelio de la arteria femoral, lo que demuestra que la ERC induce células Tie2-positivas durante la lesión vascular.

65 9.5.4 CONCLUSIONES

La ERC disminuyó la función del músculo liso vascular y estimuló la transición osteoblástica y la calcificación vascular. La disminución de los efectos de la activina elevada en la ERC con mActRIIA-Fc inhibió la fibrosis renal dependiente de Smad, bloqueó la transición osteoblástica aórtica, aumentó la diferenciación del músculo liso vascular y disminuyó la calcificación vascular.

5

9.6 EJEMPLO 6: EL PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DE ACTIVINA EN LA PATOGÉNESIS DE LA OSTEODISTROFIA RENAL DE LA ERC-TMO

9.6.1.1 INTRODUCCIÓN

10

La enfermedad renal crónica-trastorno mineral óseo (ERC-TMO) incluye la calcificación vascular y la osteodistrofia. La ERC aumenta la activina circulante (un ligando de la superfamilia de TGF β) y la señalización de activina (Figura 21A). La inhibición de la señalización de ActRIIA con un ligando trampa del receptor de activina de tipo IIA (ActRIIA) (mActRIIA-Fc) inhibe la calcificación vascular y previene la hipertrofia cardíaca. Este ejemplo demuestra el papel de la señalización de activina en la patogénesis de la osteodistrofia renal.

15

9.6.1.2 MÉTODOS

20

Los ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica (SIMULACIÓN; n=12) con operación simulada manifiestan diabetes e hipercolesterolemia. Se indujo ERC con hiperfosfatemia, FGF-23 elevado y reducción del 60% de la tasa de filtración glomerular (ERC-3) mediante nefrectomía 5/6 a las 14 semanas de edad en los ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica, y es un modelo de calcificación vascular aterosclerótica. Los ratones con ERC-3 fueron tratados con mActRIIA-Fc 10 mg/kg (mActRIIA-Fc; n=15) o vehículo (VEH; n=13), fueron inyectados por vía intraperitoneal semanalmente a partir de las 22 semanas de edad y estudiados a las 28 semanas mediante histomorfometría esquelética y microtomografía computarizada. Los resultados de ERC-3 se compararon con los de ratones naturales (WT; n=5) y SIMULACIÓN.

25

9.6.2 RESULTADOS

30

En relación con WT (volumen de hueso esponjoso/volumen de tejido [VH/VT]: 12,90%), los ratones SIMULACIÓN mostraron un VH/VT reducido (10,92%) asociado a enfermedad ósea adinámica. La inducción de la ERC-3 causó una enfermedad ósea de recambio rápido en ratones VEH, y una menor VH/VT (11,22%); esto se invirtió con 6 semanas de tratamiento con mActRIIA-Fc (13,28%). La inducción de ERC-3 causó una reducción del grosor trabecular, que se invirtió con 6 semanas de tratamiento con mActRIIA-Fc. Los ratones con ERC-3 tratados con VEH demostraron una mayor superficie de erosión/superficie ósea y un mayor número de osteoclastos/100 mm de longitud ósea (1,83% y 62,32/100 mm, respectivamente) en comparación con los SIMULACIÓN (1,05% y 33,40/100 mm), que se mitigaron con mActRIIA-Fc (1,23% y 38,37/100 mm). Los ratones con ERC-3 tratados con VEH también demostraron una mayor superficie de osteoblastos/superficie ósea y un mayor número de osteoblastos/100 mm de longitud ósea (1,58% y 110,63/100 mm, respectivamente; P<0,05) en comparación con WT o SIMULACIÓN (Figura 21B y Figura 21C, respectivamente). mActRIIA-Fc redujo significativamente tanto la superficie de osteoblastos/superficie ósea como el número de osteoblastos/100 mm de longitud ósea (0,68% y 43,18/100 mm; P<0,05) en comparación con VEH. A pesar de la reducción significativa en el número de osteoblastos en relación con VEH, la tasa de aposición mineral con el tratamiento mActRIIA-Fc se mantuvo (0,42 y 0,40 $\mu\text{m}^3/\text{día}$, respectivamente), con una tasa de formación ósea/osteoblasto significativamente mayor (0,17 frente a 0,48 $\mu\text{m}^3/100$ células/año, respectivamente; P<0,05 frente a VEH), que fue similar a WT (0,42 $\mu\text{m}^3/100$ células/año) (Figura 21D).

35

40

45

Tabla 13. Resultados histomorfométricos (media + EEM)

	Simulación	ERC-3 + Vehículo	ERC-3 + mActRIIA-Fc
VO, %	10,9±1,3	11,2±0,8	13,3±1,2
Grosor trabecular (placa), μm	30,9±2,1	31,8±1,7	33,2±1,9
Separación trabecular (placa) μm	269,4±17,3	261,9±16,6	238,1±24,9
Volumen de osteoide/VO, %	0,3±0,1	0,4±0,1	0,2±0,1
Superficie de osteoide/superficie ósea, %	2,5±0,6	2,9±0,7	1,7±0,4
Grosor del osteoide, μm	2,1±0,4	1,9±0,3	1,9±0,2
Superficie de erosión/superficie ósea, %	1,1±0,2	1,8±0,5	1,2±0,5
Número de osteoclastos/ perímetro óseo, #/100 mm	33,4±5,1	62,3±19,5	38,4±15,4
Superficie de osteoclastos/superficie ósea, %	1,0±0,2	1,7±0,5	1,1±0,5
Tasa de aposición mineral/día, $\mu\text{m}/\text{día}$	0,4±0,0	0,4±0,1	0,4±0,0
Marcas dobles/superficie ósea, %	3,0±0,9	3,7±1,0	1,6±0,3

	Simulación	ERC-3 + Vehículo	ERC-3 + mActRIIA-Fc
Marcas individuales/superficie ósea, %	8,0±0,9	10,1±1,1	10,3±1,9
Superficie mineralizante/superficie ósea, %	7,0±0,9	8,8±1,1	6,8±1,1
Tasa de formación ósea/superficie ósea, mm³/cm²/año	10,8±2,3	13,9±2,5	9,5±1,2
Tiempo de retardo de la mineralización, días	1,9±0,4	1,9±0,5	1,3±0,3
Tiempo de maduración osteoide, días	6,3±1,4	5,4±0,9	4,9±0,5
EEM= error estándar de la media			

mActRIIA-Fc no afectó la hiperfosfatemia ni los niveles de FGF-23.

5 9.6.3 CONCLUSIONES

El aumento de activina circulante contribuye a la osteodistrofia de recambio rápido asociada a la ERC-3. La inhibición de la señalización de activina con mActRIIA-Fc, un ligando trampa de ActRIIA, aumentó el volumen óseo en la ERC-3 al inhibir la resorción ósea y normalizar la tasa de aposición mineral y la tasa de formación ósea/osteoblasto, contrarrestando los efectos negativos de la ERC.

15 9.7 EJEMPLO 7: RESULTADOS DE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA CUANTITATIVA PARA MASA ÓSEA Y CALCIFICACIÓN VASCULAR AÓRTICA ABDOMINAL EN SUJETOS EN HEMODIÁLISIS TRATADOS CON NIVELES DE DOSIS CRECIENTES DE hACTRIIA-Fc

15 9.7.1 INTRODUCCIÓN

La osteodistrofia renal de recambio rápido se caracteriza por una disminución de la masa ósea cortical y un aumento de la trabecular, lo que da lugar a un mayor riesgo de fractura. La hActRIIA-Fc, una proteína de fusión de receptor de activina de tipo II-IgG1, bloquea la señalización de la activina A y puede reducir la osteoclastogénesis y promover la maduración de los osteoblastos en el hueso, según datos *in vitro*. El presente análisis en sujetos en hemodiálisis (HD) evaluó el efecto de hActRIIA-Fc sobre la densidad mineral ósea (DMO) y la calcificación vascular aórtica abdominal usando tomografía computarizada cuantitativa (TCc).

25 9.7.2 MÉTODOS

En un estudio de hActRIIA-Fc en sujetos en HD para la corrección de la anemia, los sujetos que respondían al agente estimulante de la eritropoyetina (AEE) fueron lavados de su efecto AEE hasta que la hemoglobina (Hb) fue <10 g/dl, luego se aleatorizaron a hActRIIA-Fc 0,3 mg/kg (n=9), 0,5 mg/kg (n=8), 0,7 mg/kg (n=9; 7 completados, 2 en curso), o placebo (PBO; n=9) administrados por vía subcutánea cada 28 días durante un máximo de 8 ciclos de dosis. Actualmente se está inscribiendo un grupo de dosis que utiliza un ciclo de dosis de 14 días. Se evaluó a los sujetos para los efectos sobre la Hb, los parámetros de seguridad, DMO, calcificación vascular y los biomarcadores del recambio óseo. Los fracasos del tratamiento (Hb <9 g/dl) se corrigieron con ESA/transfusión. Se obtuvieron TCc de la cadera, la columna lumbar y la aorta abdominal en el nivel basal y después de la fase de tratamiento de 225 días.

35 9.7.3 RESULTADOS

De los 35 sujetos que se aleatorizaron en el estudio, 20 tenían evaluaciones de TCc emparejadas (PBO: n=3; 0,3 mg/kg: n=6; 0,5 mg/kg: n=5; y 0,7 mg/kg: n=6). Algunos sujetos con TCc emparejada tuvieron una exposición limitada a hActRIIA-Fc debido al fracaso del tratamiento. La Tabla 14 muestra los resultados de DMO y calcificación vascular para PBO y cada grupo de dosis de hActRIIA-Fc. hActRIIA-Fc pareció mitigar los efectos de la osteodistrofia renal de recambio rápido sobre la DMO cortical y trabecular y ralentizar la progresión de la calcificación vascular, en comparación con PBO.

Tabla 14

	PBO	n	hActRIIA-Fc					
			0,3 mg/kg	n	0,5 mg/kg	n	0,7 mg/kg	n
Días con el fármaco del estudio	107,3	3	107,2	6	152,6	5	151,8	6
DMO cortical del cuello femoral, % medio de CNB	-0,91%	3	-1,38	5	1,56%	5	0,90 %	4
Sujetos con >2% de aumento de la DMO cortical del cuello femoral, %	0,00%	3	20,00%	5	40,00%	5	75,00%	4

	PBO	n	hActRIIA-Fc				
			0,3 mg/kg	n	0,5 mg/kg	n	0,7 mg/kg
DMO lumbar (trabecular), % medio de CNB	12,59%	3	7,95%	6	0,54%	5	1,93%
Puntuación total de Agatston, % medio de CNB	58,42%	3	24,89%	6	17,26%	5	7,42%
Sujetos con <15% de aumento en la puntuación de Agatston, %	33,33%	3	83,33%	6	80,00%	5	100,00%
Raíz cuadrada de la puntuación volumétrica (mm ³), CFB medio	4,54	3	11,07	6	1,23	5	1,26
CNB= cambio desde el nivel basal.							

9.7.4 CONCLUSIONES

- 5 Estos datos demuestran que hActRIIA-Fc, en una forma dependiente de la dosis, invierte los efectos de la osteodistrofia renal de recambio rápido sobre el hueso cortical y trabecular, y ralentiza la progresión de la calcificación vascular.

10 **9.8 EJEMPLO 8 RESULTADOS DE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA CUANTITATIVA PARA MASA ÓSEA Y CALCIFICACIÓN VASCULAR AÓRTICA ABDOMINAL EN SUJETOS EN HEMODIÁLISIS TRATADOS CON NIVELES DE DOSIS CRECIENTES DE ACTRIIA-HFC (SEQ ID NO:7; "SOTATERCEPT"):**

9.8.1 INTRODUCCIÓN

15 Véase Introducción (Sección 9.7.1) y Métodos (Sección 9.7.2) para el Ejemplo 6 (Sección 9.7). Este ejemplo presenta datos adicionales del estudio realizado en el Ejemplo 6 (Sección 9.7), obtenidos en una fecha posterior en el estudio.

9.8.2 RESULTADOS

20 Se aleatorizó a un total de 35 sujetos y recibieron al menos una dosis de placebo o ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7; "sotatercept") como se indica en la Tabla 15.

Tabla 15. Sujetos aleatorizados y subconjunto de análisis TCc

Sujetos	Placebo	Sotatercept 0,3 mg/kg	Sotatercept 0,5 mg/kg	Sotatercept 0,7 mg/kg
Aleatorizados y que recibieron ≥1 dosis de placebo o sotatercept	9	9	8	9
Medidas de TCc en el nivel basal y en el día 225	4	6	5	6

25 La disposición de los sujetos se representa en la Figura 22A, incluyendo los sujetos con mediciones de TCc emparejadas en el nivel basal y en el día 225. La mayoría de los sujetos a los que se interrumpió el tratamiento del estudio tuvieron un fracaso del tratamiento que requirió rescate, generalmente porque la concentración de hemoglobina era inferior a 9 g/dl. La mayoría de los sujetos a los que se interrumpió el tratamiento del estudio recibieron placebo o 0,3 mg/kg de sotatercept. Ninguno de los sujetos interrumpió el tratamiento debido a un acontecimiento adverso. Además de los 21 sujetos con mediciones de TCc emparejadas, 12 requirieron terapia de rescate debido al fracaso del tratamiento con hemoglobina durante la fase de tratamiento, 9 de los cuales requirieron rescate dentro de los 3 primeros ciclos de dosis.

30 Entre los sujetos con mediciones de TCc emparejadas, las características demográficas y clínicas basales fueron en general similares en todos los grupos de tratamiento (Tabla 16). Sin embargo, hubo un tiempo sustancialmente mayor en 35 diálisis en el grupo placebo, que también fue el grupo más joven. También hubo diferencias entre los grupos en las puntuaciones basales de biomarcadores y de Agatston (Tabla 17).

Tabla 16 Características demográficas y clínicas basales de los sujetos con mediciones de TCc emparejadas.

	Placebo (n=4)	Sotatercept 0,3 mg/kg (n=6)	Sotatercept 0,5 mg/kg (n=5)	Sotatercept 0,7 mg/kg (n=6)
Edad, media, años	51,3	57,3	60,8	63,0
Mujeres, n (%)	1 (25,0)	6 (66,7)	0 (0,0)	4 (66,7)
Raza, n (%)				

	Placebo (n=4)	Sotatercept 0,3 mg/kg (n=6)	Sotatercept 0,5 mg/kg (n=5)	Sotatercept 0,7 mg/kg (n=6)
Blanca	1 (25,0)	3 (50,0)	3 (60,0)	5 (83,3)
Negra	2 (50,0)	3 (50,0)	2 (40,0)	1 (16,7)
Asiática	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Etnia, n (%)				
Hispana	0 (0,0)	2 (33,3)	3 (60,0)	2 (33,3)
No hispana	4 (100,0)	4 (66,7)	2 (40,0)	4 (66,7)
Peso después de la diálisis, media, kg	65,5	80,3	79,4	84,5
Índice de masa corporal, media, kg/m²	24,2	27,7	26,9	29,9
Diabetes, n (%)	2 (50,0)	5 (83,3)	5 (100,0)	5 (83,3)
Paratiroidectomia, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Tiempo en diálisis, media, meses	165,8	43,3	22,4	68,1
Quelante de fosfato no cárlico, n (%)*	4 (100,0)	3 (50,0)	3 (60,0)	3 (50,0)
Aglutinante de fosfato a base de calcio, n (%)*	1 (25,0)	4 (66,7)	4 (80,0)	4 (66,7)
Calcimiméticos, n (%)*	1 (25,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	2 (33,3)
Análogo de 1,25-OH vitamina D, n (%)	3 (75,0)	5 (83,3)	2 (40,0)	4 (66,7)

* Los sujetos podrían recibir varios tipos de quelantes.

Tabla 17 Biomarcadores basales medios, DMO por área y puntuaciones de Agatston de sujetos con mediciones de TCc emparejadas.

	Placebo (n=4)	Sotatercept 0,3 mg/kg (n=6)	Sotatercept 0,5 mg/kg (n=5)	Sotatercept 0,7 mg/kg (n=6)
PTH total basal, pg/ml	209,2	104,8	135,5	100,4
BSAP^a, µg/l	24,0	18,0	13,2	15,5
P1NP^b, ng/ml	548,3	376,2	468,4	437,5
CTX^c, pg/ml	3,152,3	2,062,5	2,266,8	2,246,5
DMO integral de cadera total, mg/cm³	276,8	286,6	280,0	281,0
DMO cortical del cuello femoral, mg/cm³	640,5	667,0	593,1	594,8
DMO media de la columna vertebral (L1, L2), mg/cm³	140,1	125,6	149,1	118,7
Puntuación total de Agatston de CV	6,498,8	9,472,7	3,618,5	1,862,1

Nota: La n refleja el número de sujetos aleatorizados con evaluaciones de TCc emparejadas; el número real de sujetos disponibles para cada parámetro puede variar. PTH=hormona paratiroidea. ^aHueso=intervalo de referencia de la fosfatasa alcalina específica (BSAP): varones, 6-30; mujeres (premenopáusicas), 3-19; mujeres (posmenopáusicas), 6-26.

^bIntervalo de referencia del N-propéptido del procolágeno de tipo 1 (P1NP): varones, 30-110; mujeres, 20-108. ^cIntervalo de referencia del telopeptido carboxiterminal (CTX): varones, 0-854; mujeres (premenopáusicas), 26-573; mujeres (posmenopáusicas), 104-1.008

	Placebo (n=4)	Sotatercept 0,3 mg/kg (n=6)	Sotatercept 0,5 mg/kg (n=5)	Sotatercept 0,7 mg/kg (n=6)
--	------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

^dLas puntuaciones de Agatston más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.

En general, se consideró que los acontecimientos adversos graves no estaban relacionados con sotatercept, no condujeron a la interrupción y se resolvieron con la continuación del mismo. No se notificaron muertes en los grupos de tratamiento con sotatercept. Los acontecimientos adversos fueron en su mayoría de gravedad leve o moderada, no relacionados con el fármaco del estudio, relativamente similares entre los grupos de tratamiento y, en general, coherentes con los antecedentes médicos de los sujetos. En el primer ciclo de dosis de 28 días y durante la fase de tratamiento de 225 días, las mediciones domiciliarias de la tensión arterial no mostraron cambios coherentes o dependientes de la dosis con respecto al valor basal entre los sujetos de ninguno de los grupos de tratamiento.

Los cambios desde el nivel basal en las puntuaciones totales de Agatston en la aorta abdominal se proporcionan en la Tabla 18. La proporción de sujetos con una progresión < 15% en las puntuaciones totales de Agatston en la aorta abdominal se muestra en la figura 22B.

Tabla 18. Nivel basal y cambio desde el nivel basal en la puntuación total de Agatston en la aorta abdominal y en la puntuación del volumen total transformado de la raíz cuadrada*

	Placebo (n=4)	Sotatercept 0,3 mg/kg (n=6)	Sotatercept 0,5 mg/kg (n=5)	Sotatercept 0,7 mg/kg (n=6)
Puntuación total de Agatston en la aorta abdominal				
Puntuación total de Agatston basal	6,498,8	9,472,7	3,618,5	1,862,1
Cambio desde la puntuación total de Agatston basal	787,8	8,578,9	225,7	171,0
% de cambio desde la puntuación total de Agatston basal	58,4	29,9	17,3	7,4
Puntuación de volumen total transformado de la raíz cuadrada				
Raíz cuadrada basal del volumen total, mm ³	39,0	46,2	33,1	27,4
Cambio desde la raíz cuadrada basal del volumen total, mm ³	3,4	11,1	1,2	1,3

Nota: La n refleja el número de sujetos aleatorizados con evaluaciones de TCC emparejadas; el número real de sujetos disponibles para cada parámetro puede variar.

* Las puntuaciones totales de Agatston y del volumen total transformado de la raíz cuadrada más bajas indican niveles más bajos de calcificación vascular.

Además, la Tabla 19 proporciona el cambio porcentual desde el nivel basal en las mediciones de la cortical del cuello femoral y la DMO volumétrica trabecular media de la columna lumbar. Se analizaron las proporciones de sujetos con un aumento >2 % en la DMO cortical del cuello femoral y se determinó que el tratamiento con sotatercept se asocia a aumentos en la proporción de sujetos con un aumento ≥2 % en el hueso cortical del cuello femoral (véanse la Tabla 19 y la Figura 22C). Véase también Malluche et al., 2014, Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 9:1254-1262. Además, en la ODR de recambio rápido, la masa ósea trabecular aumenta, como se mide por la DMO trabecular de la columna lumbar, sin una reducción de las tasas de fracturas vertebrales en la ERT en comparación con la población general (véase Leonard MB, 2009, Semin. Nephrol., 29:133-143, y Duan et al., 1999, J. Clin. Endocrinol. Metab. 84:718-722). En este contexto, el aumento de la masa ósea trabecular es de mala calidad (véase Malluche et al., 2012, J. Am. Soc. Nephrol. 23:525-532). El tratamiento con sotatercept ralentiza el aumento de la masa de hueso trabecular en la columna lumbar (Tabla 19).

Tabla 19. Nivel basal y cambio porcentual desde el nivel basal en la DMO cortical del cuello femoral y trabecular media de la columna lumbar (L1, L2)

	Placebo (n=4)	Sotatercept 0,3 mg/kg (n=6)	Sotatercept 0,5 mg/kg (n=5)	Sotatercept 0,7 mg/kg (n=6)
Cortical del cuello femoral				
DMO basal, mg/cm ³	640,5	667,0	593,1	594,8
% de cambio desde la DMO basal (n)	-1,4 (4)	-1,4 (5)	1,6(5)	-0,1 (4)
Trabecular media de la columna lumbar (L1, L2)				
DMO basal, mg/cm ³	140,1	125,6	149,1	118,7
(n)	% de cambio desde la DMO basal	10,9 (4)	8,0 (6)	0,5 (5)
				4,5 (6)

Nota: La n refleja el número de sujetos aleatorizados con evaluaciones de TCc emparejadas; el número real de sujetos disponibles para cada parámetro puede variar.

9.8.3 CONCLUSIONES

Basándose en los datos de biomarcadores basales, los sujetos de este ejemplo tenían una ODR de recambio rápido. El grupo placebo tuvo una disminución de la masa ósea cortical, un aumento de la masa ósea trabecular y un aumento de la calcificación vascular que se produjo a una tasa similar a la de otros estudios de gran envergadura sobre la ERT (Raggi et al., 2011, Nephrol. Dial. Transplant. 26:1327-1339), como era de esperar en el caso de la ODR de recambio rápido.

Los datos de TCc medidos en el nivel basal y en el día 225 (que es después de hasta ocho ciclos de dosis de 28 días), indicaron que el tratamiento de ODR de recambio rápido con sotatercept produjo un efecto sobre múltiples parámetros de la ERC-TMO, incluyendo la ralentización de la progresión de la calcificación vascular, el aumento de la masa ósea cortical del cuello femoral, y una ralentización del aumento de la masa ósea de la columna lumbar. La disminución de la calcificación vascular y el aumento de la masa ósea son coherentes con los hallazgos histológicos en el modelo de ratón *Idlr*-/- alimentado con dieta hiperlipídica, nefrectomía 5/6 para la calcificación vascular (Fang et al., 2014, Abstract, ASN Kidney Week 2014, 11-16 de noviembre de 2014, Filadelfia, PA).

9.9 EJEMPLO 9: ACTRIIA-HFC (SEQ ID NO:7, "SOTATERCEPT") AFECTA A MÚLTIPLES MANIFESTACIONES DE LA ENFERMEDAD RENAL TERMINAL

9.9.1 ANTECEDENTES

Este ejemplo presenta datos de un estudio clínico. Los Ejemplos 7 y 8 (Sección 9.7 y Sección 9.8) también presentan datos de este estudio.

Este estudio en curso, aleatorizado, con enmascaramiento único y controlado con placebo, evaluó la farmacocinética, la seguridad y el efecto sobre la hemoglobina de ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7; "sotatercept"), un ligando trampa de proteína de fusión de ActRIIA-IgG1 para la corrección de la anemia en sujetos en hemodiálisis, y exploró sus efectos sobre la calcificación vascular y la densidad mineral ósea mediante tomografía computarizada cuantitativa. Este ejemplo proporciona resultados provisionales para los grupos de dosis de 0,3, 0,5 y 0,7 mg/kg.

9.9.2 MÉTODOS

A los sujetos que respondían a los agentes estimulantes de la eritropoyetina (AEE) se les eliminó los efectos de los AEE hasta que la hemoglobina fue <10 g/dl y se les asignó aleatoriamente placebo o sotatercept administrado por vía subcutánea cada 28 días durante ≤8 ciclos de dosis. Los fracasos del tratamiento (hemoglobina<9 g/dl) se rescataron con AEE o transfusión; no se permitió el aumento de dosis intraindividual. Se obtuvieron tomografías computarizadas cuantitativas de la cadera, la columna lumbar y la aorta abdominal en nivel basal y después de la fase de tratamiento de 225 días. Se presentan resultados provisionales de los efectos de la farmacocinética, seguridad, tensión arterial domiciliaria, hemoglobina, calcificación vascular y densidad mineral ósea.

9.9.3 RESULTADOS

Entre los sujetos tratados con placebo (n=9) o sotatercept 0,3 mg/kg (n=9), 0,5 mg/kg (n=8) y 0,7 mg/kg (n=9), los acontecimientos adversos fueron en su mayoría leves/moderados, no relacionados con el fármaco del estudio, relativamente similares en tipo/gravedad entre los grupos y, en general, coherentes con los historiales médicos de los sujetos. Se produjeron dos muertes en el grupo placebo. No hubo cambios dependientes de la dosis en la tensión arterial

5 domiciliaria. En la fase de tratamiento de 225 días, la hemoglobina fue >10 g/dl en el 33%, 33%, 63% y 78% de los sujetos tratados con placebo o sotatercept 0,3, 0,5 o 0,7 mg/kg, respectivamente. Las tomografías computarizadas cuantitativas emparejadas obtenidas en 4, 6, 5 y 6 sujetos tratados con placebo o sotatercept 0,3, 0,5 o 0,7 mg/kg, respectivamente, mostraron una progresión <15% de la calcificación vascular en el 33%, 80%, 80% y 100%, y un aumento >2% de la densidad mineral ósea cortical del cuello femoral en el 0%, 20%, 40% y 75%, respectivamente.

9.9.4 CONCLUSIONES

10 Sotatercept se toleró con un perfil de seguridad aceptable en hemodiálisis, sin aumentos de la tensión arterial domiciliaria. Hubo respuestas dependientes de la dosis a sotatercept en hemoglobina, calcificación vascular y densidad mineral ósea.

9.10 EJEMPLO 10: LA SEÑALIZACIÓN DESORDENADA DE ACTRIIA EN ERC CONTRIBUYE A LA CALCIFICACIÓN ATROSCLERÓTICA Y A LA FIBROSIS RENAL

15 Este ejemplo se refiere a experimentos descritos y realizados en otros ejemplos descritos en el presente documento, incluido el Ejemplo 4.

9.10.1 MÉTODOS

20 9.10.1.1 Producción de modelos animales

Se adquirieron machos ateroscleróticos deficientes en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*ldlr*^{-/-}) (acervo C57B1/6J) de Jackson Laboratories y se alimentaron con una dieta hiperlipídica (42% de calorías procedentes de grasa) a partir de las 12 semanas de edad. Los ratones son obesos, resistentes a la insulina a las 22 semanas de edad, diabéticos a las 28 semanas de edad e hipercolesterolemicos.

30 Se utilizó un procedimiento de dos etapas para crear una enfermedad renal crónica, como se ha descrito anteriormente. (Davies MR, et al. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1559-1567; Davies MR, et al. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 917-928). Se aplicó electrocauterio al riñón derecho a través de una incisión de 2 cm en el flanco a las 12 semanas postnatales, seguido de una nefrectomía total izquierda a las 14 semanas de edad. La intensidad del cauterio se varió para producir una lesión renal moderada (ERC-3) que se confirmó mediante aclaramientos de inulina a las 20 semanas de edad (Fig. 33A, B). Los animales de control se sometieron a operaciones simuladas en las que se expuso y movilizó el riñón apropiado, pero no se trató de ninguna otra forma. En este estudio se usaron cinco grupos de ratones (Fig. 23B). El primer grupo era ratones C57B1/6J naturales alimentados con una dieta de comida normal (WT). Este fue el grupo de función renal y dieta normales usado para los valores de control normativos. El segundo grupo era ratones *ldlr*^{-/-} que se alimentaron con una dieta hiperlipídica y se sometieron a una operación simulada (Simulación). Este grupo sirvió como grupo de control para determinar el efecto de la enfermedad renal. El tercer grupo era ratones *ldlr*^{-/-} con FR reducida equivalente al estadio 3 de ERC humana alimentados con dieta hiperlipídica (ERC-3) con eutanasia a las 22 semanas, el grupo de calcificación vascular de referencia (ERC-3) usado en la Fig. 25A, B, C. El cuarto grupo era ratones *ldlr*^{-/-} con ERC-3 que recibieron inyecciones subcutáneas de vehículo (solución salina tamponada con fosfato) dos veces por semana a partir de las 22 semanas hasta la eutanasia a las 28 semanas (ERC-3 V). El quinto grupo era ratones *ldlr*^{-/-} con ERC-3 que reciben inyecciones subcutáneas de mActRIIA-Fc (Celgene, Summit, NJ), 10 mg/kg dos veces por semana a partir de las 22 semanas hasta la eutanasia a las 28 semanas (ERC-3 R). La dosis usada demostró previamente en estudios FC/FD ser una dosis eficaz para la estimulación de la formación ósea.

45 El segundo modelo de ERC usado era el homólogo murino del síndrome de Alport ligado al cromosoma X, que es una deficiencia en el gen de la cadena a5 del colágeno de tipo IV, COL4A5. (Rheault MN, et al. J. the Am. Soc. Neph. 2004; 15: 1466-1474). Se trata de un modelo de enfermedad renal espontánea, y se usó a lo largo de los resultados para confirmar los efectos de la ERC inducida por ablación renal. Se adquirieron parejas reproductoras de Jackson Laboratories y se criaron para experimentos. Los machos hemigírgotos desarrollaron espontáneamente una enfermedad renal comparable a la ERC humana en estadio 3-4 a los 150 días del nacimiento y desarrollaron hematuria en el día 75 de vida.

55 En todos los casos, la eutanasia se realizó bajo anestesia. Se usó anestesia intraperitoneal (xilazina 13 mg/kg y ketamina 87 mg/kg) para todos los procedimientos. Se tomaron muestras de sangre de la vena safena 1 semana después de la segunda cirugía para evaluar la función renal posquirúrgica basal. En el momento del sacrificio, se extrajo sangre por punción intracardíaca y se diseccionaron en bloque el corazón y la aorta.

9.10.1.2 Aclaramientos de inulina

60 Los aclaramientos de inulina se realizaron a las 20 semanas o a las 26 semanas, si la eutanasia fue a las 28 semanas, según las instrucciones del fabricante (BioPal Inc., Worcester, MA).

9.10.1.3 Cuantificación de la calcificación química

65 Se diseccionaron las aortas en el momento del sacrificio y se eliminó todo el tejido extraño mediante disección roma bajo un microscopio de disección. Los tejidos se desecaron durante 20-24 horas a 60 °C, se pesaron y se trituraron con un

mortero y mano de mortero hasta convertirlos en polvo. El calcio se eluyó en HCl 1N durante 24 horas a 4°C. El contenido de calcio del eluido se analizó mediante el método de la complejona de cresolftaleína (Sigma, St Louis, MO), según las instrucciones del fabricante, y los resultados se corrigieron para el peso seco del tejido.

5 9.10.1.4 Análisis de sangre

El suero se analizó el día de la extracción de sangre para nitrógeno ureico en sangre (BUN), calcio y fosfato mediante métodos de laboratorio en autoanalizadores estándar realizados por un animalario. Los niveles plasmáticos de activina (Fitzgerald Industries, Acton, MA), folistatina (MYBIOSOURCE Inc., San Diego, CA) y 3 similar a la folistatina (MYBIOSOURCE Inc.) se determinaron en ensayos de ELISA. Los niveles séricos de Dkk1 se analizaron con un ELISA (R&D Systems, Minn., MN). Para los ensayos ELISA, se extrajo sangre por vena safena o punción cardíaca en el momento de la eutanasia. Todas las muestras de sangre se colocaron en hielo en el momento de la extracción. Las muestras de plasma EDTA pobre en plaquetas se hicieron mediante una centrifugación de 2 etapas a 6000 rpm durante 5 minutos y 14000 rpm durante 2 minutos, ambos a 4 °C. Las muestras se almacenaron congeladas a -20 °C o menos hasta su uso.

15

9.10.1.5 Histología e inmunohistoquímica

Los tejidos aórticos y renales se fijaron en formol tamponado neutro al 10% durante toda la noche, después se transfirieron a etanol al 70% a 4 °C, se incorporaron en parafina y se prepararon secciones de 5 micras. Los portaobjetos se desparafinaron en xileno, se deshidrataron en una serie graduada de etanol y se volvieron a hidratar. Se usó tinción tricrómica de Masson para detectar la fibrosis renal y cardíaca y la tinción con rojo de alizarina se usó para detectar la calcificación, según protocolos estándar. (Gregory CA, et al. Analytical Biochem. 2004; 329: 77-84). Para la inmunotinción, los portaobjetos se bloquearon en suero de cabra normal al 20% durante 20 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche. Los portaobjetos se lavaron con PBS y se bloquearon en suero de cabra normal al 20% durante 20 minutos antes de la incubación con el anticuerpo secundario Alexa 488 de cabra anti-conejo 1:400 (Life Technologies, A11008) a temperatura ambiente durante 30 min, o usando el kit TSA para la amplificación de la señal según las instrucciones del fabricante (Life Technologies, T 20932). Para la tinción inmunofluorescente doble, las secciones se bloquearon en suero de cabra al 20% y se tiñeron secuencialmente con los primeros anticuerpos primarios y secundarios y con los segundos anticuerpos primarios y secundarios usando anticuerpos secundarios Alexa 488 y Alexa 568 de cabra anti-conejo 1:400 (Life Technologies, A11008 y A11011) o el kit TSA para la amplificación de la señal según las instrucciones del fabricante (Life Technologies, T20932 y T20934). Cuando se usaron anticuerpos primarios de la misma especie para la doble tinción los portaobjetos se calentaron 5 min en tampón citrato en microondas antes de la segunda tinción. (Tóth ZE, J. HistoChem. & CytoChem. 2007; 55: 545-554). Anticuerpos primarios usados en este estudio para la inmunotinción: anticuerpo policlonal de conejo anti-ActRIIA 1:250 (Abcam, ab 135634), anticuerpo policlonal de conejo anti-inhibina beta A 1:100 (Santa Cruz, sc-50288), anticuerpo policlonal de conejo anti-CD31 1:50 (Abcam, ab28364) y anticuerpos policlonales de conejo anti- beta-catenina 1:500 (Abcam, ab32572).

9.10.1.6 RT-PCR

40

El ARN se extrajo de aortas y riñones usando kits RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA). Se trató 1 µg de ARN total con DNase y se retrotranscribió usando el kit de síntesis de ADNc iScript de Bio-Rad (Hercules, Ca) según las instrucciones del fabricante, en un ciclador térmico de Veriti (Applied Biosystems). Los cebadores se diseñaron usando el programa informático Vector NTI (Invitrogen, Grand Island, NY) o Primer Express (Life Technologies, Grand Island, NY). Tras la transcripción inversa se llevó a cabo PCR en tiempo real usando el instrumento de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems), SYBR Green de Sigma (St. Louis) y el kit de PCR de Invitrogen. Cada reacción se realizó por triplicado a 95 °C, 45 s y 60 °C, 30 s, y 60 s a 72 °C durante 40 ciclos. Esto fue seguido de un ciclo de fusión, que consistió en un aumento escalonado de la temperatura de 60 °C a 95 °C. Se observó un único pico predominante en la curva de disociación de cada gen, lo que corroboraba la especificidad del producto de la PCR. Los números Ct (valores umbral) se fijaron dentro de la fase exponencial de la PCR y se usaron para calcular los niveles de expresión de los genes de interés. Se usó B2m como patrón interno y normalizar los valores. Se generó una curva estándar que consistía en Ct frente a diluciones logarítmicas de ADNc (correspondientes al logaritmo del número de copias) amplificando diluciones sucesivas de ADNc correspondientes a una cantidad desconocida de amplicón. Se realizaron controles negativos inactivando la transcriptasa inversa hirviéndola durante 5 minutos antes de la RT-PCR para asegurar que no se amplificaba ADN genómico.

55

9.10.1.7 Immunotransferencia (análisis Western)

Se prepararon lisados proteínicos de células enteras de riñón y aorta de los ratones con tampón de lisis RIPA (Thermo Scientific) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Santa Cruz). Los lisados (20 µg) se cargaron en geles de SDS-PAGE al 8-12% y se sometieron a immunotransferencia con anticuerpos contra la inhibina β-A (Santa Cruz), α-tubulina (Santa Cruz), actina-α de músculo liso (Sigma), Runx2 (Cell Signaling), Myocd (Santa Cruz), ACVRL1 (Origene), ACVR1 (Cell Signaling), Erk1/2 (Cell Signaling), fosfo-Erk1/2 (Cell Signaling), ACVR1B (Origene), col1a1 (Santa Cruz), Smad2/3 (Cell Signaling) o fosfo-Smad2/3 (Cell Signaling). En los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se usó la misma proteína de lisado de células enteras. Para reducir la unión inespecífica, las muestras se limpiaron previamente usando perlas de agarosa de proteína A prelavadas (Cell Signaling). Las muestras previamente limpiadas se incubaron durante

la noche con el anticuerpo fosfo-serina (Abcam). A continuación los complejos IP-anticuerpo se capturaron en perlas de agarosa de proteína A y las proteínas se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia.

5 Se realizó el análisis estadístico usando ANOVA. Todos los datos se expresan como media ± DE, a menos que se especifique otra cosa en la leyenda de la figura. Las diferencias entre grupos se evaluaron *a posteriori* usando el método LSD de Fisher y se consideraron significativas a $p < 0,05$. Los datos de todos los grupos representan una "n" de 7-15. Para el análisis de PCR en tiempo real se usó un mínimo de 3 muestras en cada grupo experimental. Para los datos de calcificación vascular en la Fig. 26C, los recuadros representan la mediana y los intervalos intercuartílicos (del percentil 25 a 75), y las barras de error presentan 1,5 veces el intervalo intercuartílico por debajo del percentil 25 y por encima del 10 percentil 75. Las medianas se compararon usando el método de ANOVA de Holm-Sidak para comparaciones múltiples, $p < 0,05$, como nivel crítico de diferencia significativa.

9.10.2 RESULTADOS

15 9.10.2.1 Diseño experimental y función renal en un modelo de ERC

El ratón *ldlr*^{-/-} alimentado con dieta hiperlipídica es un modelo de calcificación vascular aterosclerótica que requiere tanto la dieta como el genotipo para producir calcificación vascular aterosclerótica. (Davies MR, et al. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1559-1567; Towler DA, et al. J. Biological Chem. 1998; 273: 30427-30434). La función renal se redujo de forma análoga a la ERC humana en estadio 3 (ERC-3) en ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica mediante lesión cortical renal y nefrectomía contralateral (Fig. 33A, B). Los ratones con ERC-3 eran hiperfosfatémicos (**Tabla 20**), coherente con la aparición de hiperfosfatemia en ERC humana de estadio 3b-4. (Isakova T, et al. Kidney Int 2011; 79: 1370-1378).

Tabla 20: Parámetros bioquímicos séricos en los animales probados

Parámetro	Grupo 1 Natural	Grupo 2 Simulación	Grupo 3 ERC-3 V	Grupo 4 ERC-3 R
Raza de ratón	C57/BJ6	<i>ldlr</i> ^{-/-}	<i>ldlr</i> ^{-/-}	<i>ldlr</i> ^{-/-}
Dieta	Comida	Hiperlipídica	Hiperlipídica	Hiperlipídica
Cirugía	Ninguna	Simulación	ECR	ECR
Semanas posnatales	28	28	28	28
Tratamiento	Ninguno	Ninguno	Vehículo	mActRIIA-Fc
N	12	15	14	15
BUN (mg/dl)	24,0 ± 4,6	20,6 ± 3,7	37,7 ± 7,6*	36,5 ± 5,8*
Ca (mg/dl)	8,3 ± 1,8	8,9 ± 0,9	9,4 ± 0,8	8,8 ± 0,3
Fósforo (mg/dl)	8,9 ± 0,2	7,9 ± 2,3	11,0 ± 1,6*	11,8 ± 1,2*

*: $p < 0,05$, grupos 3 y 4 comparados con el grupo 2.

25

9.10.2.2 Niveles del receptor de activina de tipo IIA (ActRIIA) en la ERC

Se analizaron las aortas de ratones *ldlr*^{-/-} con ERC-3 alimentados con dieta hiperlipídica para receptores de tipo II de la 30 superfamilia de TGFβ que son un componente de unión al ligando de los heteromultímeros de receptores de la superfamilia compuestos por receptores de tipo II y tipo I (ALK). El receptor de activina de tipo II A (ActRIIA) se expresó en las células musculares lisas vasculares (CMLVA) (Fig. 24A, B). La ERC-3 producida en los ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica indujo la regulación a la baja de ActRIIA en la aorta (Fig. 24A). Sin quedar ligado a teoría particular alguna, esto es coherente con la internalización y degradación de ActRIIA producida por altos niveles 35 circulantes de ligando informados en otros tejidos. (Simone ND, et al. Endocrinology 1998; 139: 1147-1155; Liu ZH, et al. J. Endocrinology 2006; 189: 409-421). No se detectó ActRIIA en células endoteliales mediante detección inmunohistoquímica e inmunofluorescente. (Fig. 24B).

40 9.10.2.3 Efectos vasculares del ligando trampa de ActRIIA en la ERC

Los efectos de la supresión de los niveles de ActRIIA inducida por la ERC se analizaron en homogeneizados aórticos de 45 ratones con ERC-3 tratados con vehículo o con el ligando trampa de ActRIIA (mActRIIA-Fc) (Fig. 25A, B). La transición osteoblástica estimulada por ERC-3 se evaluó mediante la expresión de ARNm para Runx2 y fosfatasa alcalina (Alp) en las aortas de ratones *ldlr*^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica. La ERC-3 estimuló su expresión y el tratamiento con mActRIIA-Fc invirtió los efectos de la ERC (Fig. 25A). Tanto la expresión de Runx2 como la de Alp representan biomarcadores de la transición osteoblástica en la aorta que se invirtieron por el tratamiento con mActRIIA-Fc. El ARNm aórtico de 22α de músculo liso o transgelina (Tagln), un biomarcador de células musculares lisas vasculares diferenciadas,

(Li L, Miano, et al. Circulation Res. 1996; 78: 188-195) se redujo por la ERC-3 y se estimuló por mActRIIA-Fc. La ERC-3 también provocó una disminución de la expresión del ARNm de miocardina aórtica (Myocd), el factor de transcripción específico de las células musculares lisas vasculares, pero la miocardina no se vio afectada por el tratamiento con mActRIIA-Fc. En términos de los efectos de ERC-3 y el tratamiento con mActRIIA-Fc en los niveles proteínicos aórticos de los respectivos ARNm estudiados en la Fig. 25A, la ERC aumentó los niveles aórticos de Runx2 y Alpl y mActRIIA-Fc los normalizó (Fig. 25B, no se muestran datos para Alpl). La ERC redujo los niveles aórticos de Tagln y actina de músculo liso alfa (aSMA), otro biomarcador de células musculares lisas vasculares diferenciadas, y el tratamiento con mActRIIA-Fc los aumentó (Fig. 25B, no se muestran datos para Tagln). Los niveles de miocardina no cambiaron por la ERC o el tratamiento con mActRIIA-Fc.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

El ratón *Idlr*-/- alimentado con dieta hiperlipídica es un modelo de aterosclerosis, calcificación atherosclerótica y diabetes de tipo 2 (Al-Aly Z, et al. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol. 2007; 27: 2589-2596; Towler DA, et al. J. Biological Chem. 1998; 273: 30427-30434). Identificaron, entre otras cosas, que la ERC-3 causaba la acumulación de depósitos de calcio en los ateromas aórticos en ratones con ERC-3 tratados con vehículo (ERC-3 V) (Fig. 26A) y aumentaba los niveles totales de calcio tisular (Fig. 26B). Los depósitos de calcio visibles no estaban presentes en los ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (ERC-3 mActRIIA-Fc). Además, el mActRIIA-Fc redujo el contenido de calcio tisular aórtico a niveles similares a los observados en los ratones naturales y simulados, y a niveles significativamente inferiores a los presentes en el momento del establecimiento del tratamiento con mActRIIA-Fc en el grupo de ERC-3 (Fig. 26B).

9.10.2.4 Señalización de ActRIIA en la aorta

La transducción canónica de señales por la superfamilia de TGF β implica la unión del ligando a los receptores de tipo II que activan su actividad de serina/treonina cinasa y que estimulan la asociación y fosforilación de los receptores de tipo I, las cinasas Alk (véase la representación en diagrama en la Fig. 34). La superfamilia de TGF β utiliza siete cinasas Alk, y Alk4 (ActRIB) es el receptor de tipo I más frecuentemente asociado a la señalización de ActRIIA. (Abe Y MT, et al. Growth Factors (Chur, Suiza) 2004; 22: 105-110). Los niveles de ActRIIA no disminuyeron en los homogeneizados aórticos aislados de ratones con ERC-3 como se evidencia en la Fig. 24, y no se asociaron con niveles tisulares reducidos de Alk4 y Alk1 (Fig. 27A). Alk5 y Alk2, otros receptores de tipo I asociados con la señalización de ActRIIA, no fueron detectables. La actividad de ActRIIA se evaluó midiendo el efecto de la heteromultimerización del receptor (por ejemplo, fosforilación de Smad reguladoras). ERC-3 disminuyó los niveles aórticos de fosfoSmad 2/3 (Smad 2/3 activado), y mActRIIA-Fc los aumentó en comparación con ERC-3V (Fig. 27A, B). También se analizó la señalización de ActRIIA no canónica (Fig. 34). (1) la cinasa map (fosfo-Erk1/2) disminuyó con la ERC y no se vio afectada adicionalmente por mActRIIA-Fc (Fig. 27A), y (2) los niveles de p38 y JNK en el músculo liso vascular fueron muy bajos. Además, los niveles de p-AKT de mActRIIA-Fc no se vieron afectados, lo que indica que la señalización de ActRIIA no afectó a la AKT/PI3 cinasa aórtica. La señalización de ActRIIA aórtica (fosfoSmad 3) disminuyó por la ERC y se estimuló por el ligando trampa de ActRIIA asociado con la supresión de la transición osteoblástica en las aortas ateroscleróticas por el ligando trampa de ActRIIA (Fig. 25A, B, C).

Se examinó otra vía de señalización de ActRIIA no canónica, la vía Wnt (Fig. 34). La señalización de Wnt parecía estar regulada de forma diferencial entre el endotelio aórtico y las CMLV. La β -catenina aórtica, un importante factor de transcripción canónico inducido por Wnt, se localizó mediante inmunofluorescencia en las células endoteliales, y no fue detectable en las CMLV (Fig. 28A, B). Se analizaron los niveles de Dkk1 en las CMLV como biomarcador de la actividad de Wnt. La ERC aumentó los niveles de Dkk1 en las CMLV y el tratamiento con mActRIIA-Fc redujo los niveles de Dkk1 en los ratones con ERC-3 (Fig. 28D). La disminución de los niveles aórticos de Dkk1 por mActRIIA-Fc indica que la señalización de Wnt del músculo liso vascular fue inhibida por el ligando trampa de ActRIIA. Además, los efectos del ligando trampa de ActRIIA para disminuir la actividad de Wnt renal como se muestra a continuación conducen a una disminución importante de los niveles circulantes de Dkk1 (Fig. 28E). Es muy probable que la disminución de Dkk1 sistémica afectara al endotelio. Esto provocó un aumento de la señalización de Wnt en el endotelio, donde se expresa la beta-catenina, como muestra el aumento de los niveles aórticos de Axin2 (Fig. 28C). Axin2 es un gen temprano inmediato estimulado por beta-catenina y a menudo utilizado para la evaluación de la señalización de Wnt. (Mao J, Wang J, Liu B, et al. Mol. Cell 2001; 7: 801-809).

9.10.2.5 Efectos del ligando trampa de ActRIIA sobre la señalización de aklotho y ActRIIA renal

Se examinaron los niveles renales de aklotho y los efectos de ERC-3 y del tratamiento con mActRIIA-Fc. Como se muestra en la Fig. 29A, el tratamiento con mActRIIA-Fc indujo un aumento significativo de los niveles renales de aklotho. Se examinaron los niveles renales de ActRIIA y la señalización de ActRIIA. Los niveles renales de ActRIIA no se vieron afectados por ERC-3 (Fig. 29B). Un ligando primario de ActRIIA, la activina A, fue fuertemente inducida en los ratones con ERC-3 y suprimida por el tratamiento con mActRIIA-Fc (Fig. 31A-D). La falta de anticuerpos fosfo-Alk disponibles impidió la detección de la activación del receptor de tipo I, requiriéndose en su lugar un anticuerpo fosfoserina para inmunoprecipitar. Se realizaron inmunotransferencias del precipitado con anticuerpos anti-Alk. La fosforilación de Alk4 no se vio alterada significativamente en los riñones enfermos del modelo de ERC-3 ni por el tratamiento con mActRIIA-Fc (Fig. 29B). Sin embargo, la fosfoSmad 2/3 renal aumentó con ERC-3 y disminuyó con mActRIIA-Fc, lo que indica que el componente de la activación de Smad 2/3 renal en ERC mediado a través de ActRIIA implicaba un Alk diferente de Alk4 (Fig. 29C).

Se examinaron los efectos del ligando trampa ActRIIA en la fibrosis renal. La Fig. 30A-D muestra una disminución de la fibrosis renal en secciones de corteza renal teñidas con tricrómico de ratones con ERC-3 tratados con mActRIIA-Fc (Fig. 30C y Fig. 30D) en comparación con ratones tratados con ERC-3V (Fig. 30A y Fig. 30B). La Fig. 35A-D muestra secciones coronales de riñón de bajo aumento con flechas que identifican de dónde se tomaron las secciones de alto aumento de la Fig. 30A-D y las puntas de flecha que delinean las reacciones de cicatrización de la lesión renal por electrocauterización. mActRIIA-Fc disminuyó la reacción de cicatrización, coherente con el papel de la activina en la cicatrización. Además, mActRIIA-Fc disminuyó la proteinuria estimulada por ERC-3 (Fig. 30E), coherente con la disminución de la fosfoSmad 2/3 renal y la fibrosis inducida por el tratamiento con mActRIIA-Fc.

10 9.10.2.6 Posibles ligandos de ActRIIA en la ERC

Existen múltiples posibles ligandos de ActRIIA, que incluyen las activinas A y B, el factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11), las proteínas morfogenéticas óseas 9 y 10 (BMP9 y 10) y otras BMP, tales como la BMP7, que tienen menor afinidad por el receptor. Pero un ligando primario de ActRIIA es la activina. Utilizando dos modelos de ERC, se identificó que los niveles circulantes sistémicos de activina A eran 10 veces elevados en el modelo de ERC ablativa *Idlr*-/- y 5 veces elevados en el modelo de ratón con síndrome de Alport Col4A5 (Fig. 31A, B). Los niveles de activina B, GDF11 y BMP9 no se vieron afectados por la ERC en estos modelos. Fisiológicamente, se cree que existe una pequeña cantidad de activina libre en la circulación. Sin quedar ligado a teoría particular alguna, esto puede deberse a que los niveles de inhibidores son estequiométricamente iguales a los niveles de activina. Las activinas se asocian con factores inhibidores circulantes, folistatina y 3 similar a la folistatina (fstL3), (Welt C, et al.

Experimental Biol. and Med.

2002; 227: 724-752) e inhibina cuyos niveles circulantes (Fig. 36A, B) y niveles tisulares no se vieron afectados ni reducidos por la ERC-3. La estequiometría de folistatina, fstL3 e inhibina (por ejemplo, la suma de 620 pg/ml más 400 pg/ml de inhibina no medida (Sharpe RM, et al. J. Andrology 1999; 20: 94-101)) a niveles de activina A (>5000 pg/ml) en la circulación indica que la ERC produce niveles significativos de activina libre - un evento patológico que hace de la activina A un factor circulante activo en la ERC. Estos datos indican que las enfermedades renales producen uno o más ligandos circulantes de ActRIIA que podrían regular a la baja ActRIIA vascular.

30 Se analizaron tejidos renales del modelo de calcificación aterosclerótica *Idlr*-/- para activina A (un homodímero de inhibina betaA (Inhba)) para identificar la fuente del aumento de activina circulante. El ARNm de Inhba aumentó por la ERC en el riñón (Fig. 31C) y aumentaron los niveles de proteína activina (inhibina β-A) (Fig. 31D). La expresión renal de activina se localizó en los miofibroblastos peritubulares de ratones con ERC-3 (Fig. 32A, B).

35 9.10.3 CONCLUSIONES

Este ejemplo demuestra que mActRIIA-Fc aumentó la señalización de ActRIIA aórtica evaluada por los niveles de Smad2/3 fosforiladas. Además, el tratamiento con mActRIIA-Rc invirtió la desdiferenciación del músculo liso vascular, la transición osteoblástica y la calcificación de la placa neointima inducidas por la ERC. En los riñones enfermos, mActRIIA-Fc inhibió, en lugar de estimular, la señalización de ActRIIA y disminuyó la fibrosis renal y la proteinuria. El tratamiento con mActRIIA-Fc redujo los niveles renales y circulantes de Dkk1, lo que demuestra que la activación de Wnt se produjo aguas abajo de ActRIIA. Este ejemplo demuestra que la señalización desordenada de ActRIIA en la ERC contribuye a la ERC-TMO y a la fibrosis renal, identifica la señalización de ActRIIA como diana terapéutica en la ERC, y demuestra que un ligando trampa de activina (por ejemplo, mActRIIA-Fc) puede utilizarse en el tratamiento de la ERC.

10. DESCRIPCIÓN de LAS SECUENCIAS

Tabla 21: Información de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	polipéptido precursor de ActRIIA humano	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MQAAAKLAFAVFLISCSSGAJLQRSETQECLFFNA NWEKDRTNQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNIS GSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYP CCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPY YNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMYPP VLVPTQDPGPPPSPLGLKPLQLLEVKAARGRFGC VWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLP GMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKG SLSDFLKANVVSNELCHIAETMAROLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG LAALKFEAGKSAAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAACDGPV DEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVVIKKRPVLR DYWQKHAGMAMLCTTIERCWDHDAEARLSAGC VGERITQMQRITNIITTEDIVTVVIMVTNVDFPPK ESSL
2	ActRIIA soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada	ILQRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPP
3	ActRIIA soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados	ILQRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCEGNMCNEKFSYFPEM
4	secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIA humano	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTGCCGTC TTTCTTATCTCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTG GTAGATCAGAAAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTA ATGCTAATTGGAAAAAGACAGAACCAATCAA ACTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGAT AAACGGGGCATTGTTGCTACCTGGAAAGAAT ATTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGT TGTGGCTGGATGATACTGCTATGACAGG ACTGATTGTGTAGAAAAAGACAGCCCTGA AGTATAATTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTG TAATGAAAAGTTTCTTATTTCCAGAGATGGA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AGTCACACAGCCCACCTCAAAATCCAGTTACACC TAAGCCACCCATTACAACATCCTGCTCTATICC TTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTC ATTGTCGATTTGGGTGTACAGGCATCACAAG ATGCCCTACCCCTCTGACTTGTCCAACCTCAA GACCCAGGACCACCCCCCACCTCTCCATTACTA GGGTTGAAACCACTGCAAGTTATTAGAAGTGAAG GCAAGGGGAAAGATTGGTTGTCGCTGGAAAGCC CACTTGCATAACGAATATGTCGCTGTCAAAATA TTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGOCAAAAT GAATACGAAGTCTACAGTTGCTGGAAATGAAG CATGAGAACATATTACAGTCATTGGTGCAGAA AAACGAGGACCCAGTGTGATGTGGATCTTGG CTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACTA TCAGACITCTTAAGCTAATGTCGCTCTITGG AATGAACTGTGTCATATTGAGAACCATGGCT AGAGGATTGGCATATTTCATGAGGATATACT GGCCTAAAAGATGCCACAAACCTGCCATATCT CACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTT GAAAAACAAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTT TGGGTTGGCCTTAAATTGAGGCTGGCAAGTC TGCAGGCATAACCCATGGACAGGTTGGTACCCG GAGGTACATGGCTCCAGAGGTTAGAGGGTG CTATAAACTCGAAAGGGATGCAATTGAGGA TAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGG AACCTGGCTCTCGCTGACTCTGCAGATGGAC CTGTAGATGAATACATGTCGCTATTGAGGAGG AAATTGOCAGCATTCCATCTTGAAGACATGC AGGAAGTTGTTGTCATAAAAAAAAAAGAGGCGT GTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGA ATGGCAATGCTCTGTAACCAATTGAAAGAATGT TGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT GGATGTGTAAGGTAAGAATTACCCAGATGCA GAGACTAACAAATATTACACACAGAGGACAT TGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGA CTTCTCCAAAGAACATGAGTCATGAA
5	secuencia del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIA soluble humano (extracelular)	ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTT TTCTTAATGCTAATTGGAAAAAGACAGAAC AACTCAAACCTGGTGTGAACCGGTGTTATGGTGAC AAAGATAAACGGGGCGATIGTTGCTACCTGG AAGAATATTCTGGTCCATTGAAATAGTGAAC CAAGGTGTTGCTGGATGATATCAACTGCTAT GACAGGACTGATTTGTAAGAAAAAGACAG CCCTGAAGTATATTGTTGCTGTGAGGGCAA
		TATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTCCAGAG ATGGAAGTCACACAGCCCACCTCAAAATCCAGTT ACACCTAACGCCAACCC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
6	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIA fusionado con un dominio Fc	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDXIVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK X2VSNKALPVPIEKTISKAKOQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNOQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNX3HYTQKSLSLSPGK* (wherein X1 is D or A; X2 is K or A and X3 is N or A)
7	Dominio extracelular de ActRIIA humano fusionado con el dominio Fc humano	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPYCYDK DKRRHCFATWKNSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYPCCEGNMCNEKF SYFPEMEV TQPTSNPVTPKPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	Secuencia conductora de melitina de abeja melífera (HBML)	MKFLVNVALVFMWYISIYA
9	Secuencia conductora del activador tisular del plasminógeno (TPA)	MDAMKRLGCCVLLCGAVFVSP
10	Conductor nativo de ActRIIA	MGAAAKLAFAVFLISCSSGA
11	Secuencia aminoterminal de ActRIIA-hFc y mActRIIA-Fc	ILGRSETQE
12	Proteína ActRIIA-Fc con delección de los 15 aminoácidos carboxiterminales del dominio extracelular de ActRIIA	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPYCYDK DKRRHCFATWKNSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYPCCEGNMCNEKF SYFPEMTO GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPVPIEKTISKAKOQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia conductora de TPA	

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQE CLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDCKRRHCFA TWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRIDCIVEKKD SPEVYFCCEGNMCNEKF SYFPEMEVTQPTSNPV TPKPPTGGGHTCPCPAPELLOGPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKCQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNO QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK.
14	Secuencia del ácido nucleico que codifica ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia conductora de TPA	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCCGCC GGGGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAG GAGTGTCTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTT ATGGTGACAAAAGATAAAACGGGGCATGGTTTGC CTACCTGGAAAGAATATTCTGTTTCCATTGAAAT AGTGAACACAAGGTTGTTGGATGATATCAA CTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAAGAAAAAAA AGACAGCCCTGAAGTATATTCTGTTGCTGTGA GGGCAATATGTAAATGAAAAGTTTCTTATT TCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACCTCAA TCCAGTTACACCTAACGCCACCCACCGGTGGTGG AACTCACACATGCCAACCGTGCCCCAGCACCTGA ACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCTTGAGGTCAAGTCAACT GGTACGTGGACCGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGGGTCTCACCGTCT GCACCCAGGACTGGCTGAATGCAAAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGTCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGGCAAAAGGG CAGCCCCGAGAACCGACAGGTGTACACCCCTGCC CCATCCCCGGAGGAAGTACCAAGAACCGAGGT CAGCCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGGCAATG GGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACCGT CCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCT ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGGCAAGTGG CAGCAAGGGAAACGTTCTCATGCTCCCTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGCAGAA
		GAGCCTCTCCCTGTCCTCCGGTAAATGAGAATTC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
15	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio ECdelecionados y los 4 aminoácidos carboxiterminales del dominio ECdelecionados (aminoácidos 25-130 de SEQ ID NO:28) y con una mutación L79D	ETRECIYNNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP
16	secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	MTAPWVALALLW GSLWP GSGR GEAETRECIYNN ANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTVYEPPPTAPT LLTVLAYSILPIGGLSLIVLLAFW MYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFCV WKAQLMNDVAVKIFPLQDKQS WQSEREIFSTPG MKHENILQFIAAEKRGSNLEV ELWLITAFHDKG LTDYVLKGNIIWNE LCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGE GHKPSIAHRDFKSKN VLLKSOLTAVLADF GLAVRFEPGKPPGDTHQVQGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAM QLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVVVHKMRPTIKD HWLKHPQUAQLCVTIECWDHDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGITSDCLVSLVT SVTNVDLPPKES SI
17	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 19-134 de SEQ ID NO:16)	SGRGEAETRECIYNNANWELRTNQSGLERCEGE QDKRLH CYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTVYEPPPTAPT
18	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados (aminoácidos 19-119 de SEQ ID NO:16)	SGRGEAETRECIYNNANWELRTNQSGLERCEGE QDKRLH CYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
19	secuencia del ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	ATGACOGGCCCTGGGTGGCCTCGCCCTCCTC TG GGGATCGCTGTGGCCCCGGCTCTGGGCGTGGG GAGGCTGAGACACGGGAGTGCA TCTACTACAA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CGCCAACCTGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGA GCGGCCTGGAGCGCTCGAAGGGCAGCAGGAC AAGCGGCGTCACTGCTACGCCCTCTGGCCAAC AAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGG CTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAG GCAGGGAGTGTGTGGCCACTGAGGGAGAACCCCC AGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCT GCAACGAQCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTG GGGGGCCCGGAAGTCACGTACCGAQCACCCCCG ACAGCCCCCACCCCTGCTCACGGTGCTGGCCTAC TCACIGCTGCCCATCGGGGGCCTTCCCCTCATC GTCCCTGCTGGCTTTGGATGTACCGOCATCGC AAGCCCCCTACGGTCACTGTGGACATCCATGAG GACCCCTGGGCCCTCACCAACCCATCCCTGGTG GGCCTGAAGGCCACTGCAQCTGCTGGAGATCAA GGCTCGGGGGCGCTTGGCTGTGTCTGGAAGGC CCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAGAT CTTCCCACCTCAGGACAACGAGTCCTGGCAGAG TGAACGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAA GCAAGAGAACCTGCTACAGTTCAATTGCTGCCGA GAAGCGAGGCTCAACCTCGAAGTAGAGCTGT GGCTCATCACGGCTTCCATGACAAGGGCTCCC TCACGGATTACCTCAAGGGAAACATCATCACAT GGAACGAAACTGTGTCACTGAGAGACGATG TCACGAOGCCTCTACATAACCTGCACTGAGGGATOTO CCCTGGTGGCGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCT ATPGCCCACAGGGACTTTAAAGTAAGAATGTA TTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTCTGGCT GACTTTGGCTTGGCTGTTCGATTTGAGGCCAGGG AAACCTCCAGGGGACACCCACCGACAGGTAGG CACGAGACGGTACATOCTGCTCTGAGGTGCTCGA GGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCCTCCT GGCATTTGACATGTATGCCATGGCTTGGTGTCT GTGGGAGCTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGA CGAACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTGA GGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTCGTGGAGG AGCTGAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATG AGGCCACCATAAAGATCACTGGTTGAAACAC CCGGGCCCTGGCCACGCTTGTGTGACCATCGAG GAGTGTGGACCATGATGCAAGAGGCTCGCTG TCCGGGGGCTGTGTGGAGGAGGGGTGTCCCTG ATTCGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTGGAC TGTCTCGTTCCCTGGTGCACCTCTGTCACCAATG TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATTAA
20	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64; SEQ ID NO: 17) fusionado con un dominio Fc	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		SGRGEAETRECIYVANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCVASWANSSTIELVKKGCWLDDFN CY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGEVTVYEPPPTAPTGGGHTCPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64) con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados (SEQ ID NO:18) fusionados con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYVANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCVASWANSSTIELVKKGCWLDDFN CY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGEVTVYEPPPTAPTGGGHTCPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 5 aminoácidos carboxiterminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-129 de SEQ ID NO:28) y con una mutación L79D	ETRECIYVANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CVASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPP
23	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:28) y con una mutación L79D	ETRECIYVANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CVASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGOPEVT YEPP
24	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:28) y con una mutación L79D y con secuencia conductora de TPA	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGCPEVTYEPPPTGGG THTCPPCPAPELLOGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSESLSPGK*
25	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio ECdelecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio ECdelecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:28) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGCPEVT YEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLOGPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:16)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG CPEVTYEPPPTAPT
27	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados (aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO:16)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
28	Secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humano (R64)	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MTAPWVALALLW GSLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFC CCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYQH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRGCV WKAQLMNDPVAVKIFPLQDKQS WQSEREIFSTPG MKHENLLQFTAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNTWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF GLAVRERPGKPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV
		DEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKD HWLKH PGGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVE ERVSLIRR SVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKES SI
29	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 19-134 de SEQ ID NO:28)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFC CCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPT
30	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados (aminoácidos 19-119 de SEQ ID NO:28)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFC CCEGNFCNERFTHLPEA
31	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:28)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFC CCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
32	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados (aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO:28)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFC CCEGNFCNERFTHLPEA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
33	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio ECdelecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio ECdelecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D.	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPT
34	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio ECdelecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio ECdelecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D y con secuencia conductora de TPA.	MDAMKRGGLCCVLLLCGAEVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
35	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio ECdelecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio ECdelecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D.	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
36	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:28) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLH CYASWRNNSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPT
37	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:16) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
38	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:28) con mutación L79D fusionada con un dominio Fc con un conector GGG	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFOCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAFTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTGPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK*
39	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:16) con mutación L79D fusionada con un dominio Fc	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFOCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAFTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
40	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:28) con mutación L79D fusionada con un dominio Fc y con secuencia conductora de TPA	MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFOCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAFTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTGPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK*
41	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:16) con mutación L79D fusionada con un	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	dominio Fc y con secuencia conductora de TPA	MDAMKRGGLCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAFTGGGHTCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
42	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada que tiene una secuencia carboxiterminal de variante (desvelada en el documento de patente WO2007/053775)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCL EGPAHE
43	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada que tiene una secuencia carboxiterminal de variante (desvelada en el documento de patente WO2007/053775) que tiene una mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCL EGPAHE
44	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada que tiene una secuencia carboxiterminal de variante (desvelada en el documento de patente WO2007/053775) que tiene una mutación L79D fusionada con un dominio Fc con un conector TGGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG
		GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCL EGPAHEGCGHTCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
45	Secuencia del ácido nucleico que codifica SEQ ID NO:24	

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		<p>ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGGAGCAGTCCTCGTTGCCCGGGGCCGCCAAACCCCGGAATGTATTATTACAAATGCTAATGGGAACTCGAACCGGAGGGAAACAGGATAAAACGCCCTCCATTGCTATGCGTGTGGAGGAACCTCTCCGGGACGATTGAACGGTCAAGAAAAGGGTGCTGGGACGACGGATTTCATTGTTATGACCGCCAGGAATGTGTGGAGACCGAAGAGAAATCCGCAAGGCTATTCCTGTTGCGAGGGAAATTCTGTAATGAAACGGTITACCCACCTCCCCGAAGCCGGCGGGCCCCAGGGTGGAACTCACACATGCCAACGGTGCCTAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACOTGGACCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCGAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTCACCCCTGCCCTGGGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTCAAGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCGAACGGCTCC TTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCAAGTCAACCAACCAACTACACCGAGAAGAGGCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA TGA</p>
46	Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64; SEQ ID NO:29) fusionado con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYNNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFN CY
		<p>DRQECVATEENPQVYFCOCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKFKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYCKVSNEALPVPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK</p>

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
47	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64) con los 15 aminoácidos carboxiterminales delecionados (SEQ ID NO:30) fusionada con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGE QDKRLNCYASWRNSSGTIELVKKGWDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPDKDLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKINWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPEN NYKTTTPVLDSDGSPLVSKLTVDKSRWQQQNVI SCSVMHEALTHINHYTQKSLSLSPGK
48	Cebador 1 de RT-PCR de Runx2	CCGCACGACAACCGCACCAT
49	Cebador 2 de qRT-PCR de Runx2	CGCTCCGGCCCACAAATCTC
50	Cebador 1 de qRT-PCR de Alp	ACGTGGCTAACAGATGTCATC
51	Cebador 2 de qRT-PCR de Alp	CTGGTAGGCGATGTCCTTA
52	Cebador 1 de qRT-PCR de Osterix	TAGTGGTTGGGTTGTTACCGC
53	Cebador 2 de qRT-PCR de Osterix	AACCAAATAACTCTTATTCCCTAAGT
54	Cebador 1 de qRT-PCR de Klotho	GCTCTCAAAGCCCACATACTG
55	Cebador 1 de qRT-PCR de Klotho	GCAGCATAACGATAGAGGCC
56	Cebador 1 de qRT-PCR de Sm22-alfa	GTTCCAGACTGTTGACCTCTT
57	Cebador 2 de qRT-PCR de Sm22-alfa	CTGCGCTTCTTCATAAACCC
58	ARNm humano de Runx2	GTGTGAATGCTTCATCGCTCACAAACAAACCA CAGAACCAAGTCGGTGCAAACCTTCCTCCAG GAGGACAGCAAGAAGTCTCTGGTTTTAAATGG TTAATCTCCGCAGGTCACTACCAGCCACCGAGA CCAACAGAGTCATTAAAGGCTGCAAGCAGTATT TACAACAGAGGGTACAAGTTCTATCTGAAAAAA AAAAGGAGGGACTATOGCATCAAACAGCCTCT TCACCCACAGTGACACCATGTCAGAAAACCTCT TTGGGATCCGAQCAACAGCCCGCGCTTCAGCC CCCCTCCAGCAGCCIGCAGCCCCGGCAAAATGA GCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAACAG

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCA GCAGCAGCAACAGCAGCAGCAACAGCAGG AGGCCGGCGCGCGCGCTGCAGCGCGCGCGCG GCTGCGGGCGCGCGAGCTGCAGTGCCCCGGTTC CGGCCGCCCCACGACAACCCACCATGGTGA GATCATGCCGACCACCCCGCGAACCTCGTCCG CACCGACAGCCCCAACTTCTGTGCTCGGTGCT GCCCTCGCACTGGCGCTGCAACAAGACCTGCC CGTGGCCTCAAGGTGTAACCCCTCGAGAGGT ACCAGATGGGACTGTGGTTACTGTATGGCGGG TAACGATAAAATTATTCTGCTGAGCTCCGGAA TGCCTCTGCTGTATGAAAAACCAAGTAGCAAG GTTCAACGATCTGAGATTGTGGCCGGAGTGG ACGAGGCAAGAGTTACCTTGACCATAACCGT CTTCACAAATCCTCCCCAACGTAAGTACCTATCA CAGAGCAATTAAAGTTACAGTAGATGGACCTCG GGAACCCAGAAGGCACAGACAGAACGCTTGATG ACTCTAAACCTACTTTGTTCTGACCCCTCAG TGATTITAGGGCGCATTCCTCATCCCAGTATGAG AGTAGGTGTCGGCGCTCAGAACCCACGGCGCTC CCTGAACCTGACCAAGTCCTTTAATCCACA AGGACAGAGTCAGATTACAGAACCCAGGGAGG CACAGTCTTCCCGCCGCTGGTCTATGACCGATG CTTACCCCTCTACCTGAGCCAGATGACGTCCC CGTCCATCCACTCTACCCACCCCGCTGTCTCCAC ACGGGGCACTGGCTTCTGCCATCACCGATGT GCGTAGGGCGATTCAAGATGATGACACTGCCAC CTCTGACCTCTGCCTCTGGCCTTCACTCTCAGT AAGAAGAGCCAGGCAGGTGCTTCAGAACTGGG CCCTTTTCAGACCCCCAGGCAGTTCCTAACGAT TTCATCCCTCACTGAGAGCCGCTTCTCCAACCC ACGAATGCACTATCCAGGCACCTTTACTTACAC CCCCCAGTCACCTCAGGCATGTCCTCGGTAT GTCCGGCCACCACTCACTACCCACCTACCTGCC ACCACCCCTACCCCGCTCTCCCAAAGCCAGAG TGGACCCCTCCAGACCCAGCAGCACTCCATATCT CTACTATGGCACTCGTCAGGATCCTATCAGTT CCCATGGTGCCGGGGGGAGACCGGTCTCCCTCC AGAATGCTCCGCCATGCACCAACCCCTCGAAT GGCAGCAGCGTATTAATCCAAATTGCTAAC CAGAATGATGGTGTGACGCTGATGGAAGCCAC AGCAGTTCCTCAACTGTTTGCGACCATATTGA AGAATGGATGAATCTGTTGGCGACCATATTGA AATTCCCTCAGCAGTGGCGACAGTGGTATCTGGGG GCCACACATCCACACGTATCAATATAACATATA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TAGAGAGAGTCATATAATGTTATATCGATTAG CTATCTACAAAGTGCCTATTITTTAGAAGATTT TCATTCACTCACTCAGTCATGATCTGCAGCCAT AAGAGGGTAGATATTGAGAAGCAGAAGGCTCA AGAGAGACAATTGCAATCGAGCTTCAGATIGTT TACTATTIAAGATGTACITTTACAAAGGAACAA AGAAGGGAAAAGGTATTTTGTGTTGTT GGTCTGTTATCATCAATAACCTGTTCATATGCC AATTCAAGAGGGTGACTCCAGGTTCAAGGAGG GAGAAGAGCAAAGCCGCTTCCTCTCTGTGCTTT GAAACCTCACACCCCTCACCGTGGCAGCTGTGTA TOGACCAGTGCCTCCGCAGACAGCTCACAAAAA CCAGTTGAAGGTGCACTAAAGGGACATGAGGTA GAATGGATGTTCCATCACAGTACCATCATTCA GAATAACTCTCCAATTCTGCTTTCAAGACATG TGCAGGTCTCATCTGAACCTGTTGGGTTGTTT TTTTTTTTCTCTCTCAAGAAAGTGACTT CAAAAATAACTGATCAGGATAGATTATTATT TTACTTTAACACTCTCTCCCCCTTCCACT GAACCAAAAGAAATCCCCTCCCTAAACCTG CTTCTCTTTTATGCAAAACTGAAAATGGCAA TACATTATATAGCCATAATGGTATAGATAGTG ATTGCGTTGGCTATGTTGTTTCTTTTT AAATTATGAATATGTTGAAAATCTGAGGTAAC TGCTAACGTGAATGGTCATAACTTAAAGAT ATATTATAATTATTAATGACATTGGACCCCT GAAACATTCTTAGTGTATTGATATGTTGACTTC GGCTCTAAAGTGCCTTATTAAATAACAAA TTCTCTAGGGCTAGAGCCATATCTGAAATA TTGCTAACGCAATTCTAGTTCATCCAGGCACAA GTGATTAAAATACTTCCATCTCCAAATAT TTTAGATATAGATTGTTGTTGATGTATGAA GAAATGTTATGTTAGTTCTTCAGATCTTGAA TGCCTCTAACACAGCTTCTCCTCTAAAGCGGT AATTAGGGATTAAAAACAAACCTTAAAGCCCT TATCAGCATGAAATGCTGGAGTGTGTT CTAACTCTTGGGTAATTATGACTCTGTCAT ATTAAAAGACAAGCACAAGTAAATCATTGAA CTACAGAAAAATGTTCTGTGGTTCATAGTAA GCAAAACTCTAAATGCCAGGCTTCATAGCAA GACATAGTCAGCTAAAGCCGACATGTGGAT AGAGGGTTCAATTATGAGACACCTAGTACAGG AGAGCAAATTGCAACCAGAGATTCTTAACCAAC CAGCCTTACCAAAACAACACAACAGGGAAACCC CAATCTGCCCTAACCAAGGCCCACTGGCAAGCT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TTCCACAGAATTCTCATTTAGAGGAAGCAGAATG ACATCACTGCCCTTGGAGTAGGTCTCTGAA AAGGCAGCAGGTTCCAGCAGGTAGCTGAGCTG AGAGGACATACTGGCCCACGGGGACCTACAGAC AGCTTGTACATTGTATTCTTACAATGGAGG GCCAAGGAGGGCAAGGGCTGGGAGTTGTGOT GTCTACTAGTGTATGAATTGAGCTAGAGTC CTTCTGTGGCATGCACCTTGACCACTCTGGCA GTCACATGCGAGATTCCAAGTGCAAATCTTA ATCCAACAAAGGATCATCTAATGACACCACAG GCCAATCCCCGCTCTCCCTCCGAAAAGTCAGG GTCCCTCATGGAACTCTCCACCCACCCAGC AGAATTAGCAGAGATTGCCCTCAAACCTAA CGGCCCCCTTGTCTCTGGCTCTCTCAAACCCA CCTTGTAGGCCACCCAGCATGCAAGGACAGCG TGTGGGCAGCTGGACCTGTGCTTCTGCTGG GAGTCTCCCTTGGAAATTCACTCTGACTCTCTA ATAAAAATGGATGGAAAGCAAAACACTTTGC CTCTAAAGCCGTATACCAAGTATGCTTAGAT AAATAAGCCACTTTCTATTACTTAAGTAAGAA GGAAGTAGTAATTGATACTATTATTGTTGTG GTGGTAGCTGAAGCACACCACTGCTCATTTAT TTGTAAGTGTAAAATATGTGTGTTGTTGAGC AGCACTTAAAAAGCCAGTGCTGGTACACAT TICAATTAAATTGACATAAAAATGCTAC CGCCACTGCCAGCTGCATCTTAAATTAAAA AGTACTATATTGTACATTATTAAATTGTTA AAAGGGCTTTTAAGTTACAGTACACATACCC GAGTGACTTAAAGGATGCTTGTGTTGAAATG TTACTATAGTGGCTGCAGOCAGCAACCCAGAAA CACTTAGAAGCTTTCTTGGGAAATTC AAGCACTCTTCTTCCACCCCACTCCAACCA CCCCAATGGGGTAATTACACATTCTAGAAC AATTCTOCCCCTTTGGCTAGGGATTAAAATT TGTGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACT GAACCCCTAATTGCACTGGGCTAGTGTGTTG TTGTTGATTCAGACCAAGCAAAGTCCTACT ACTACTGTGGAACCATGTAAGTAGTCTGGGAA TTAAAATAACGCTGGCTCTTGTAGCACAAAC ATTGCTGGAAATTGCACTCTTICAATGAGCC ACATTTCATCCATTCTAGTGTCTCACAAATT TAACCCATATCAGAGTCCAGAACAGGTACCA AGCTTGTGTTAGATTAGTGGAAATAACATICA GCCAGAAACTGAGAAACTCAACAGATTAACTAT CGTTTGCTCTTAAAGACGGTCTCACTGCCTCTCAC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TTGCCAGAGCCCTTCAAAATGAGCAAGAGAACT CCACACCATTAGGGACCATCTGTGATAAATTCA GAAGGGAGGAGATGTGTACAGCTTAAGGA TTCCCTCAATTCCGAGGAAAGGGACTGGCCAG AAATCCAGGTAATAACATGGAAACAAGAACATT AGCAAAAGTAATAATTACACCTATGGTATTGA AAGAACATAATAAAAAGACACTCTTCAAACC TTGAATTGTTGTTAGAAAACGAATGCATT AAAAATATTCTATGTGAGAATTITAGATGT GTGTTACTCATGTTACAATAACTGTTGCT TTTAATGCACTACTTGAATATATCAGCAA AACCATAACTTACAATAATTCTTAGGTATTCT GAATAAAATTCCATTCTTGGATATGCTTAC CATCTTAGGTTCTGTGAAACAAAAATATTG TACGATTTGTGTAATAACAGCTTCATTITTA TTTTTCCAATTGCTATTGCCAAGAATTGCTTT CCATGCACATATTGTAAAAATTCCGCTTGTGC CACAGGTCTGATTGTGGATGAGTTACTCTTA ACTCAAAAGGACTATTGATATTGATGTTGCA ACTGTAATTGAATTATTGGCATTTCATG ATTGTAATTAATTGAAGTTGAATTAATT TCAATAAAATGGCTTTTGTTTGTAA
59	ARNm humano de Alp	CCGGGCCTCACTCGGGCCCCCGGGCCGCCCTTA TAAGGCGGGGGGGGTGGTGGCGCCGGCGCGT TGCCTCCCCCACTCCGGCGCTTGTGCTGGACOGA CCCTGCCAGTGCTCTGCCAGGATTGGAACAT CAGTTAACATCTGACCACTGCCCAGCCACCCCC TCCCACCCACGTGATTGGCTCTGGGCTCCA GGGATAAAAGCAAGGTCTTGGGCTGACCATGATT TCACCATCTTAGTACTGGCATTGGCACCTGC CTTACTAACTCTTACTGCCAGAGAAAGAGAAA GACCCCAAGTACTGGCGAGACCAAGGCCAAGA GACACTGAAATATGCCCTGGAGCTTCAAGAAGT CAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCTCATGTT CCTGGGAGATGGATGGTGTCTCCACAGTGAC GGCTGCCGCTCATCTCAAGGGTCAGCTCCACCA CAACCCCTGGGGAGGAGACCAAGGCTGGAGATGG ACAAGTTCCCCCTGCTGGCCCTCTCAAGACGT ACAACACCAATGGCAGGTCCCTGACAGGCC GGCACCGCCACCGCCCTACCTGTTGTOGGGTGAAG GCCAATGAGOGCACCGTGGGGTAAOCGCCAGC CACTGAGCCTTCCCGTCAACACCAACCCAGGG GAACGAGGTCACTCCATCTGCGCTGGGCCAA GGACGCTGGAAAATCTGTGGCATTGTGACCAC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CACGAGAGTGAACCATGCCACCCCCAGCGCCG CCTACGCCCACTCGGCTGACCGGGACTGGTACT CAGACAACGAGATGCCCTTGAGGCGTTGAGCC AAGGCTGTAGGACATCGGCTTACCAAGCTCATGC ATAAACATCAAGGACATTGACGTGATCATGGGG GGTGGCCGAAATACATGTACCCCAAGAATAA AACTGATGTGGAGTATGAGAGTGACGAGAAAG CCAGGGGCAAGGAGCTGGACGGCCTGGACCTC GTGACACCTGGAAGAGCTTCAAACCGAGATAAC AAGCACTCCCACCTCATCTGGAACCGCACGGAA CTCCCTGACCCCTTGACCCCCAACAAATGTGGACTAC CTATTGGGTCTCTTGAGCCAGGGGACATGCAG TACGGAGCTGAAACAGGAACAAACGTGACGGACCC GTCACCTCTCGAGATGGTOGTGGTGGCCATCCA GATCCCTCGGAAGAACCCCAAAGGCTTCTTCTT GCTGGTGGAAAGGAGGGAGAATTGACCACGGGC ACCATGAAGGAAAAGCCAAGCAGGAGGCTGCA GAGGGGGTGGAGATGGACCCGGCCATCGGGCA GGCAGGCAGCTTGACCTCTCGGAAGACACTCT GACCGTGGTCACTGGGGAACATTCCCACGTCTT CACATTTOGTGGATACACCCCCCGTGGCAACTC TATCTTGGTGTGGCCCCCATGCTGAGTGACAC AGACAAGAAGGCCCTCACTGCCATCCTGTATGG CAATGGGCTGGCTACAAGGTGGTGGGGACTATGCTC ACAACAACCTACCAAGGCCAGTCTOCTGTGCCCC TGCOCACAGGAGACCCACGGGGGGAGGACGTG GCCGTCTTCTCCAAGGGGCCATGGCGCACCTG CTGCACGGCGTCCACGAGCAGAACTACGTCCCC CACGTGATGGCGTATGCAAGCTGCATCGGGGCC AACCTGGGCCACTGTGCTCTGCCAGCTCGGCA GGCAGCCTTGTGCAGGGCCCCCTGCTGTCGG CTGGCCCTCTACCCCCCTGAGCGTCTGTTCTGA GGGCCAGGGCCCGGGCACCAACAAGCCCGTG ACAGATGCCAACTTCCCACACGGCAGCCCCCCC CTCAAGGGCAGGOAGGTGGGGGCTCTCAG CCTCTGCAACTGCAAGAAAGGGGACCCAAGAA ACCAAAGTCTGCCOCCTCACCTCGCTCCCTCTG GAATCTTCCCCAAGGOCCAAACCCACTCTGCG CTCCAGCCTTGTCTCCCTGCCCCGCTGCCCTTGG CCAACAGGGTAGATTCTCTTGGGCAGGCAGAG AGTACAGACTGAGACATTCTCAAAGCCTCTTA TTTCTAGCGAACGTAATTCTCCAGACCCAGA GGCCCTGAAGGCTCGTGGAACATTCTGGATCT GACCCCTCCAGTCTCATCTCCCTGACCCCTCCCAC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CCCATCTCCTTACCTCTGGAACCCCCCAGGCC TACAATGCTCATGTCCCTGTCCCCAGGCCAGC CCTCCTCAGGGAGTTGAGGTCTTCCTCA GGACAAGGCCTTGCTCACTCACTCACTCCAAGA CCACCAGGGTCCCAGAAOCGGTGCCTGGGT GGCCATCTACCCAGCGTGCCTCAGGCCGGGA AGAGOCACCTGCGCAAGGGCTCACACTCCTGGCT CTGAACACACACGCCAGCTCCCTCTGAAGCGA CTCTCCTGTTGGAACGGCAAAAAAAATT TTTCTCTTTTGGTGGTGGTAAAAGGAAACA CAAACATTAAATAAAACTTCCAAATATTTC CGAGGACAAAAAA
60	ARNm humano de Osterix	CGCGGGGCGGCAGCAGCCTAGGCAGCAGCAGT AGCAGAAGCAGCAGCCGCCAGCAGCAGCAAG GACTCTGGAGTCAGAGTAGGACTGAGGACCG GAGCCTGAGTGGAACAGGGAGTGGAGCTGGCT GGGAGAGAGCGGATCCCTCCAGCACCCCTCAG GCCACCCGTGCTGCACTCTCCCTGCAGACC TCCAGAGAGGGAGAGACTCGGGACAGCCAGCC CAGGTCCCCCAAGCTCTCTCCATCTGCCTGGCTC CTTGGGACCCGTTCCCCAGCCTCAGGATGGCGT CCTCCCTGCTGAGGAGGAAGTCACTATGGCT CCAGTCCCCCTGGCATGCTGACGGCAGCGTGCA GCAAATTGGTGGCTCTAGCCCTCTGCGGGACT CAACAACTCTGGCAAAGCAGGCACAAAGAAG CCGTACTCTGGGAGTGGCAGTGAACCTTCAGCCTC AAAACCATGGGGATGCTTATCCAGCCCCCTT ACAAGCACTAATGGGCTCTTCACCTGCAGGC AGTCCCTCCAGCAOCCACCTCAAGCTATGCTAAT GATTACCTCCCTTTOCCACTCATCCCTGGGC CCACAGGCACCCAGGACCCCTGGCTACTAGTGC CCAAGGGGACAGCTCTGACTGCTGCCCCA GTGTCTACACCTCTGGACATGACACACCCCT ATGGCTCTGGTACAAGGCAGGCATCCATGCA GCATTTCAACCAAGGCCAGGCAACACTCTACTC CATGGTOGGATATGCAACCTGGAGGCAACTGG TAGGTGGTGGGAGGGCCAGGGTGTGGCTG CAAGGGACACTGCCCCACAGGCCAGCTCAGCCT CCACTGAAACCCCCAAGCTGCOCACCTACCCATCT GACTTTGCTCCCCCTTAATCCAGCCCCCTACCCCA GCTCCCCACCTCTGCAACCAAGGGCCCCAGCAT GTCTTGCCCCAAGATGTCTATAAACCCAAGGCA GTGGAAATAGTGGCAGCTAGAAGGGAGTGG TGGAGCCAACCCCCACGGGGTGCAGCAACTG GGGGTAGTGGGATATGGGGGGCAGTGGGCA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGCGCTCCTCTGCAGTCCCTAAITGCCAG GAGCTAGAGCGGCGTGGGAGCACAGCAAGGGCTGG GCTCGGAAGAAGCCCACATCCACAGCTGCCACAT CCCTGGCTGGCAAGGTGTATGGCAAGGCTTC GCACCTGAAGGCCACTTGCGCTGGCACACAGG CGAGAGGCCCTCGTCTGCAACTGGCTCTCTG CGCAAGAGGTCACTCGTCCGGATGAGCTGGA GGTCATGTGCGCACTCACACCCGGGAGAAGA AGTTCACCTGCCTGCTCTGCTCCAAGCGCTTAC CCGAAGCGACCACCTGAGCAAACACAGCGCA CCCATGGAGAACCAAGCGCCGGTCCCCCTCCCC GTGGCCCCAAGGAGCTGGGGAGGGCCGCAGC ACGGGGAAAGAGGAGGCCAGTCAGACGCCCG ACCTCTGCCTCGCCAGCAACCCAGAGAAAGC CCCTGGAGGCAGCCCTGAGCAGAGCAACTTGCT GGAGATCTOAGCCGGGTGGAAGGTCTCCCACCC CAOGGCTGCCCTGACAGTCTCTTGGCTCT AGACCACTGCTGCCAATCACTCTCTTACCCC ATGCATGCCATCCTCGGGCTCTCCCTCTGT CTCCCTCTGGCCATTCTGGGCTGGGTATCTCC TTGCATGCCCTCAAGCTCACCTCTCTTCAAC CATGAGACTGGCTTCCACAAACTCTCATCTCA GGCCCTCCCCCTGTGCGTGTACCTGCACTCCG GCTTCTAGACTCTGGCCCTGCCACACCAACAC ACTTTCTATTTGGCTCCCAACACTATTCTCCA TCTCACTCCTTOACATGTACCCCTCTGCTTCT CAAGCTTATTCCTGCTGTCCCTCAGCCTCCAGG CTTCAGTCTCCCAACTCTTACACCAATTGCTTT CCATTCTCCAGAACTCTTTCTTCTTACAAA CACAATGATAATGATAATTATTGGCCCTGGT GGCCTCTCATCAGGGTATTGGGTAGTGAC CTGGCCAGAGGGTGCCAAGAGGGGGCAGACC AGTGGGGATCTGATCCAAAGATGGGTGACC CCAGGGTCAGGGAGGCTGGCCAGGGCTGTAT ATTAAACCCCTATGTACCAAGGAGTAATGAATA TAATAATTCTATTTATGTAAGTTATGATGACGG GTCAGGTAGAGTGAAGCTGGGAGGGAAAGTGG TCCATTCTGCTAAGGAATTCTAGTCACATGC ATCTCTGATAGACAAAATGTTAGTGGAGAAGA TCTGTTAATAGAATGCTATCATCAGAATCTC AGTGATAGGGTTCTGTAATGAAGTCTCT ACAAATGGGTTAGCTACATCTGCTAAACAG TTGATGGGGTATCTCTGATTAAGGGGGATCCCT AATATCCCCAGCCCCAGCCAGAAGCTGTGAAAC CTCAAGTCCTATGGAGGGAGAAGGACTGGAA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TGTACCCCCATCTCCCTTGACTGCAGAGCAGGTT CCTCCACTGCCCAACCCCTTAGACACCATGACC CCATCAGGGTAATCCCCCTGTTGCCATGGTTATG GAGAGCTTCAGCTGCCATCTTAGATGTGCTCT TTGGGGAAAGCCCCTAACAAGGAGGACATTGGT TTGGGGGTGCACCTCTGAAGAATGGTGGGG AAGGCTTCTCTAGGATCAGATTCAAATAAGTA TGTATTGAGTGCCTACTCTGTGCAAGGCACTAT GCTAGATCTGGTGCCTAGAACGCCCTGAGAAAAG AACTTAAAGAAGCTAGGAGGACAGAAGGCCCCCA AGCTGATCTGGTGGTGCATCCACGCACCCCCAC CCTGGGACTTTGGAAGCTCCATCTCCACCTCC AGTGACTTTAAAGCCGTTCTGCTGCCCTTCTGT AACGTTGGATCCTCTTCTGTCCCTGCTGTC TCAAGGCCCCAAGTTAAAGGGTTAAAGGCCGCTG GAGCTTGGGGAGAGAACATTGTGGATGGAAG GGATCATGCCCTTGTGGAGTCTTTTTTAA TTAATAATAAAAGTGGATTGAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA
61	ARNm humano de Klotho	CGCGCAGCATGCCGCCAGCGCCCCGCCGCC GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC TGCTGGTGTGCTGGGCTGGCGGCCGCCGCC TGGCTGCGGAGCCGGGCGACGGCGCGCAGACC TGGGCCGCTGCTCGCGGCCCTCTGCCCGAG GCCGCCGGGCTCTTCAAGGGCACCTTCCCCGAC GGCTTCTCTGGGCCGCTGGCAGCAGCACGGCAA CAGACCGAGGGCGCGCTGGCAGCAGCACGGCAA GGGTGCGTCCATCTGGGACACGTTACCCACCA CCCCCTGGCACCCCCGGAGACTCCGGAAACCG CAGTCTGCCCTTGGGGCGCCCGCTGCCGCTGCA GCCGCCACCGGGGACGTAGCCAGCAGCACAGCT ACAACAACGTTCCCGACACGGAGGGCGCTGC GGAGCTGGGGTCACTCACTACCGCTTCTCCA TCTCTGGGGCGCGAGTGTGCTCCCCAATGGCAGCG GGGGCGTCCCCAACCGCGAGGGGCTGGCTACT ACCGGCGCTGCTGGAGCGGCTGCCGGAGCTG GGCGTCAAGCGCTGGTACCCCTGTAACCACTGG GACCTGCCCCAGCGCCCTGAGGACCGCTACGGC GGCTGGGCCAACCGGGCCCTGGCGACCACTTC AGGGATTACCGCGAGCTCTGCTCCGCCACTTC GGCGGTCAAGTCAAGTACTGGATCACCACCGAC AACCCCTACGTGGTGGCTGGCACCGCTACGGCC ACCGGGCGCTGGGGTACCTGGTGGCGACACAACCT CTCTGGCTCATGCCAAAGTCTGGCATCTCTA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CAATACTTCCGTCCCACTCAGGGAGGTCA GGTGTCCATTGCCCTAAGCTCTCACTGGATCAA TCCCTGAAGAACGACCGACCACAGCATCAAAG AATGTAAAAAAATCTCTGGACTTTGTACTAGGTT GGTTTGCCAAACCCGTATTATTGATGGTGA ATCCCGAGAGCATGAAGAAATAACCTTICATCTA TTCTGCCTGATTTACTGAATCTGAGAAAAAGT TCATCAAAGGAACGTGACTTTTGCYCTTIG CTTGGACCCACCTTGAGTTCAACTTTGGAC CCTCACATGAAGTTCGCCAATTGGAATCTCCC AACCTGAGGCAACTGCTTCCGGATTGACCTT GAATTAAACCACCTCTCAAATATTATTGTGGAA AATGGCTGGTTTGTCTCAGGGACCACCAAGAGA GATGATGCCAAATATATGTTACCTCAAAAAG TTCATCATGAAACCTTAAAAGCCATCAAGCTG GATGGGGTGGATGTCTCGGGTATAACGGCATGG TCCCTCATGGATGTTGAGTGGCACAGAGGT TACAGCATCAOGCOTGGACTCTTCTATGTTGAC TTCTAAGCCAGGACAAGATGTTGCCAAAG TCTTCAGGCTTGTCTACCAAAAAGCTGATAGAG AAAAATGGCTCCCTCTTACCTGAAAATCAG CCCCTAGAAGGGACATTCCCTGTGACCTTGT TGGGGAGTTGACAACTAATTCAAGTAGAT ACCACTCTGCTCAGTTACCGACCTGAATGTTT ACCTGTGGATGTCACCCACAGTAAAAGGCTTA TTAAAGTGGATGGGGTTGTGACCAAGAAGAGG AAATCCTACTGTGTTGACTTTGCTGCCATCCAG CCCCAGATCCTTACTCCAGGAAATGCACTGTT ACACATTTCGCTTCTCCCTGACTGGCCCTG ATTCTCCCTCTGGTAACCAGTCCCAGGTGAAC CACACCATCCTGCAGTAACATGCTGATGGCC AGCGAGCTTGTCCGTGTCAACATCACCCCCAGTG GTGGCCCTGGCAGCCTATGGCCCGAACCAA GGACTGCCCGCCCTCTGGCCAGGCAAGGGCGC CTGGAGAACCCCTACACTGCCCTGGCCTTIOC AGAGTATGCCCOACTGTGCTTCAAGAGCTCGG CCATCACGTCAAGCTTGGATAACGATGAATGA GCCGTATACAAGGAATAATGACATACAGTGTGG CCACAACTTCTGAAGGCCATGCCCTGGCTTGG GCATGTGTACAATGAAAAGTTAGGCATGCTCA GAATGGGAAAATATCCATAGCCTTGCAAGGCTGA TTGGATAGAACCTGCCTGCCCTTCTCCAAAAA GGACAAAGAGGTGGCCGAGAGAGAGTTTGGAAAT TTGACATGCTGGCTGGCTGAGGCCATTTCG GCTCTGGAGATTATCCATGGGTGATGAGGGACT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGCTGAACCAAGAAACAATTCTCTTCCTT ATTCACTGAAGATGAAAAAAGCTAATCCAG GGTACCTTGACTTTGGCTTAAGCATTATA CCACCATCCCTGTAGACTCAGAAAAAGAAGATC CAATAAAATACAATGATTACCTAGAAGTGCAA GAAATGACCGACATCACGTGGCTCAACTCCCCC AGTCAGGTGGCGGTAGTGCCCTGGGGITGC AAAGTGCTGAACCTGGCTGAAGTTCAAGTACGG AGACCTCCCCATGTACATAATATCCAACGGAAT CGATGACGGGCTGCATGCTGAGGACGACCAGC TGAGGGTGTATTATATGCAQAATTACATAAACG AAGCTCTCAAAGCCCACATACTGGATGGTATCA ATCTTGCGGATACTTTGCTTATTGTTAACGA CCOCACAGCTCCGAGGTTGGCCCTCATCGTTA TGCTGCAGATCAGTTGAGCCAAGGCATCCAT GAAACATTACAQAAAATTATTGACACCAATG GTTCCCGGGCCCAGAAACTCTGGAAAAGATT GTCCAGAAGAATTACCGTGTACTGAGTOCA GTTTTTTCACACCCGAAGTCTTACTGGCTT CATAGCTTTCTATTTTGCTCTATTATTCTC TCTCCCTTATTTACTACTCGAAGAAAGGCA GAAGAAGTACAAATAGTCTGAACATTTCCT ATTCAATTGAAATAATTATGCAACACACA TCAGCTGTTAACCTTGACACTCTAAGTGTGTT GAAACTGTAAATTCTACATATTGACTTCTAGA AAACATTGTCGGCTTATGACAGAGGTTG AATGGGCATAGGTGATCGTAAAATTGAATAA TGCCTAGTGCTGAAATTGTTCTCTTTGGG TGATTAaaaaACTGACAGGCACTATAATTCTG TAACACACTAACAAAAGCATGAAAAATAGGAA CCACACCAATGCAACATTGTCAGAAATTG ATGACAAGATTAGGAATTTTCTCTGCACCC ACTCTAAATTAAATTGTTCTGGAAGTAGTAA TTCGAAGAGTCTGAATAGAAAGTTATGTACCA GTAACCAATTCTCAGCTGCCATAATAATGCC GTGGCTTCCCTCTCAATCTAGTTCTATG GAAAAGAAGATGGCAGATACAGGAGAGACGAC AGAGGGTCTAGGCTGGAATGTTCTTCTGAAA GCAATGCTCTATCAAATACTAGTATTAATITAT GTATCTGGTAAATGACATACTGGAGAGCAAAT TATGGAAATGTGTTATTTATATGATTGTTGAGGT CCRTGCTAAACCTGTTGTCCTGAGGGATCTGT CTCACTGGCATCTTGTGAGGGCTTGCACATA GGAAAACCTTGATAAGTATCTGCGGAAAAACAA ACATGAATCTGTGATATTGGCTCTCAGGAA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GCATAAAGCAATTGTGAAATAACAGTATACCGCA GTGGCTCTAGGTGGAGGAAGGGAGGAAAAAGT GCTTATTATGTGCAACATTATGATTAATCTGATT ATACACCATTTCAGGAGCATCTTGAATGAAAT GACATGACCTTCCTAGAGAATAAGGATGAAA TAATCACTCATTCTATGAACAGTGACACTACTT TCTATTCTTAGCTGACTGTAATTCTTTGAGT TGATAGTTTACAAATCTTAATAGGITCAAAA GCAATCTGGTCTQAAATAACACTGGATTGTTTC TGTGATCTGAGGTCTATTATGTTTTGCTG CTACTCTGTGGAAGTAGCTTGAACTAQTTTA CTTGAAACTTCACGCTGAAACATGCTAGTGAT ATCTAGAAAGGCTAATTAGGTCTCATCCTTTA ATGCCCTTAATAAAGTCTGCTGATTTCAGA CAAGGAAGTCTCTTACACACTGGAGCTGTT TATAGATAAGTCAATATTGTATCAGGCAAGATA AACCAATGTCATAACAGGCATTGCCAACCTCAC TGACACAGGGTCTAGTGTATAATAATATACTG TACTATATAATATATCATCTTGTAGAGGTATGATT TTTCTGAAAGATAAGCTTGGTAATATTCTAT TTTAAAGTGGACTTATTAAAATTGGATGCTAGA GAATCAACTTTATTTATGTTATATTCTGAA TTATAAGAGTAATATATGTTCTTGTAAAAATT TTTAAACACAGAAACTATATGCAAAGAAAAAA ATAAAAATTATCTATAATCTCAGAACCCAGAAA TAGCCACTTTAACATTCTACGTATTTCATT TACATAGATCATATTGTATATAGTTAGTATCTT ATTAATTCTTATTATGAAACTTCCTTGTCTT ATTAGTCTTCAAAAGCATGATTTTAATAGTTGT TGAGTATTCCACCAAGGAATGTATCACAACCTT AACCGTTCCCCTTGTAGACTAGTCTTCTTATT ATGTTGATGAAATTTGTTAAAATAATTGGTT GCTACATTACTTTAATTCTTGTACTGAAAGA GAAGTAATTCTGCTCTGATAAAAGTATTATAAT ATAATAAAATCTGCCRGCAACTTTGCTCTT TCATAATC
62	ARNm humano de Sm22-alfa	TCACCACGGCGGCAGCCCTTAAACCCCTCACC CAGCCAGGCCCATCTCTGTCTGCTCGAACCCA GACACAAGTCTTCACTCCTCTOCGAGCCCTG AGGAAGCCTTGTGACTGCTTGGCTGGAGCTGGACAGGAGCA GAGGGAGTTGGCTGGAGCTGGACAGGAGCA GTOGGTGCATTTCAGGCAGGCTCTCTGAGGTG CCAGGCAGCTCCAGCTCCCTGCTAGGGAA ACCCACCCCTCTCAGTCAGCATGGGGGCCAAGC TCCAGGCAGGGTGGCTGGATCACTAGCGTCCT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGATCTCTCAGACTGGCAOCCCCGGCTCA TTGAAATGCCCGGATGACTTGGCTAGTGCAGA GGAATTGATGGAAACCACCGGGGTGAGAGGGGA GCGTCCCCATCTCAGCCAACATCCACAAGG TGTGTGTAAGGGTGCAGGCOCGGCOCGGTLAGG CCAAGGCTCTACTGTCTGTTGCCCTCAGGAG AACTTCCAAGGAGCTTICCCCAGACATOGCAA CAAGGGTCTTCATGGCATGAGCCCGAAGT GCAGTCCAAAATCGAGAAGAAGIATGACGAGG AGCTGGAGGAQCGGCTGGTGGACTGGATCATA GTGCAGTGTGGCCCTGATGTGGGCCOCGGAGAC CGTGGGCCCTGGGCTTCCAGGTCTGGCTGAAG AATGGCGTGTGATTCTGAGCAAGCTGGTGAACAGC CTGTACCCCTGATGGCTCCAAGCGGTGAAGGTG CCCGAGAACCCACCCCTCATGGCTTCAAGCAG ATGGAGCAQGTGGCTCAGTCTCTGAAGGCGGCT GAGGACTATGGGTCTCAAGACTGACATGTT CAGACTGTTGACCTCTTGAAAGGCAAAGACATO GCAGCAGTGCAGAGGACCCGTATGGCTTGGGC AGCTTGGCAGTGACCAAGAATGATGGCGACTA CCGTGGAGATCCCAACTGGTTATGAAGAAAGC GCAGGAGCATAAGAGGGAAATCACAGAGAQCC AGCTGCAGGAGGGAAAGCATGTCATTGGCTTC AGATGGCAGCAACAGAOGGGCTCCCAAGGCC GGCATGACAGGCTACGGACGACCTCGGCAGAT CATCAGTAGAGCGGAGAGGGCTAGCCCTGAG CCGGGCCCTCCCGGCTCTGGCTGCAGC TCCCGCTTAACCTGCCTCACCCACACCCGTGTG GTACCTTCAGCCCTGCCAACCTTGGAGGCTCT GTCACTGAGCAATGTAATGCACTGCACCTGGCAGC TCCCTCCCTGTGCCCTCAGCTCAAGCCAACTTCT TACCCGAAAGCATCACTGCCTTGGCCCTCC CCCGGCTGCCCCCATCACCTCTACTGTCCTCC CTGGGCTAACGAGGGAGAAGCGGGCTGGGG TAGGCTGGATGTGGGCCAACGCTTGGCTCTCC TTGGCGGCAAAAGCCATTGAAGAAGAACAG CCAGCCTGCCCCCTATCTTGTCTGGAAATATT TTGGGGTTGGAACCTAAAAAAAGGGGGGGGG ATCAATCTTCTCAAAAAAAAAAAAAAA
63	Proteína humana Runx2	MASNSLFSTVTPCQQNFFWDPSTSRRFSPSSSLQP GKMSDVSPVVAQQQQQQQQQQQQQQQQQQ QQQQEAAAAAAAAAAAAAVPRLRPPHDN RTMVEHADHPAELVRTDSPNFLCSVLPSHWRCNK TLPVAFKVVALGEVPDGTVVTVMAGNDENYSAE LRNASAVMKNQVARFNDLRFVGRSGRGKSFTLT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TVFTNPPQVATYHRAIKVTVDGPREPRRHRQKLD DSKPSLFSDRLSDLGRIPHPSMRVGVPQNPRLS NSAPSPFNPGQSQTIDPRQAQSSPPWSYDQSYP YLSQMTSPSIHSTTPLSSTRGTGLPATTOVPRRISD DDTATSDFCLWPSTL8KKSQAGASELGPFSDPQRQF PSISSLTESRFNSPRMHYPATFFYTTPVITSGMSLG MSATTHYHTYLPPPYPGSSQSQSGPFQTSSTPYLY YGTSSGSYQFPMVPGGDRSPSRMLPPCTTSNGST LLNPNLNPQNNDGVADGSHSSSPTVLNSSGRMDE SVWRPY
64	Proteína humana Alp	MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQ ETLKYLELQKLNTNVAKNIVMFLGDGMGVSTV TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFVVALSKTY NTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEQTVGVSAA ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTR VNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KDIAYQLMHNIIRDIDVIMGGGKKYMPKNKTDV EYESDEKARGTRLGDLVDTWKSEKPRYKHSHF IWNRELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRN NVTDSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGGRID HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSED TLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNISFGLAPMLS DKKPFTAILYNGNGPGYKVVGGERENVSMVDYAH NNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKOPMAHLE HOVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAG SLAAGPLLALALYPLSVLF
65	Proteína humana Osterix	MASSILLEEVEHYGSSPLAMLTAACSKFOGSSPLR DSTTLGKAGTKKPYSVGSDSLASKTMGDAYPAPP TSTINGLIISPAGSPPAPTSGYANDYPPFHSFPGPTG TQDPOLLVPKGHSSSDCLPSVYTSLDMTHPYGSW YKAGIHAGISPGPGNTPTPWWMHPGGNWLG QOOGDGLQGTLPTGPAQQPLNPQLPTYPSDFAPL NPAPYPAPHILLQPGPQHVLQDVKPKAVGNSG QLEGSGGAKPPRGASTCGGGYGGSGAGRSSCDC PNCQELERLGAAGLRKKPIHSCHIPGCGKVG KASHLKAHLRWTGERPFVCNWLFCKRFRSDHLSHQ RTHGEPPGPPPSGPKELGEGRSTGEEEASQTPRP SASPATPEKAPGGSPEQSNLLET
66	Proteína humana Klotho	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MPASAPPRRPRPPPSLSSLVLLGLGGRRLRAEPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGFLWAVOSAAAYQTEGGWQQHGKGASIWTFTHHPLAPPQDSRNASLPLGAPSPIQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLERLRELGVQPVVTLYHWDLPQLQD
		AYGGWANRALADHERDYAEELCFRHFGGQVKYWITIDNPYVVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAHNLLAHAKVWHLYNTSFRPTQOGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLQWFAKPVFIDGDYPESMKNNLSSILPDFTESKEKFKGTADFTALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWFVSGTTKRDDAKYMYYLKKFIMETLKAJKLDGVDVIGYTAWSLMMDGFEWHRGYSIRRGLFYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKNQFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSVCDFAAKQPQIAILQEMIIVTHFRFSLDWALRPLGNQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQGAWEWPYTALAPAHEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFPSQKDKEVAERVLEFDIGWLAEPIFGSGDYPWVMRDWLNRQRNNFLPYFTEDEKKLIQGTFDFLALSHYTITLVDSEKEDEPIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAVVPWGLRKVLNWLFKYGDLPMYIISNGIDDGLJHAEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAYSFNDRTAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHRYKBD SNGFPGPETLERFCPEEFTVCTECFFHTRKSLLAFIAFLFFASHSLSLIFYYSKKGRRSYK
67	Proteína humana Sm22-alfa	MANKGPSYGMSREVQSKIEKKYDEELEERLVEWIVQCGPDVGRPDRGRGLGFQVWLKNGVILSKLVNSLYPOGSKPVKVPENPPSMVFQMEQVAQFLKAAEDYGVIKTDMFQTVDLFEKGDMAAVQRTL.MALGSLAVTKNDGHYRGDPNWFMKAQEHKREFTESQEQEGKRVIGLQMGSNRGASQAGMTCYGRPRQIIS
68	Proteína humana alfa-SMA	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MCEEEDSTALVCDNGSGLCKAGFAGDDAPRAVF PSIVGRPRHQQVMVGGMGQKDSYVGDEAQSKRGI ETLKYPIEHGHITNWDDMEKIWHHISFYNELRVAPE EHPTLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETPNVPAMY VAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGCVTHNVPYIYEG YALPHAIMRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVT TAEREIVRDIKEKLGYVALDFENEMATAASSSSLE KSYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAG IHETITYNSIMKCDIDIRKDLYANNVLSGGTTIMYPG IADRMQKEITALAPSTMKJKHAPPERKYSVWIGGS ILASLSTFQQMWISKQEYDEAGPSIVIRKCF
69	Proteína humana MYOCD	MTLLGSEHSSLIRSKFRSVLQLRLQQRRTQEQLAN QGIIPPLKRPAEFTHEQRKHLDSDKAKNSLKRKARN RCNSADLVNMHILQASTAERSIPTAQMKLKRARL ADDINEKIALRPGLPLELVEKNILPVDSAVERKAIKG
		NQVSFSKSTDAAFEEEDSSSDGLSPDQTRSEDPQN SAGSPPDAKASDTPSTGSLGTNQDLASGSENDRN DSASQPSHQSDAGKQGLGPPSTPIAVHAAVKSKS LGDSKNRHKKPKDPKPKVKKLKYHQYIPPDQKA EKSSPPMDSAAYARLLQQQLFLQLQILSQQQQQ QHRSYLGMIHQAKLKEPNEQMVRNPNSSTPLSN TPLSPVKNSFGQTGVSSFKPGPLPPNLDDLKVS LRQQLRIRGLPVSGTKTALMDRLRPFQDCSGNPV PNFGDITTVTFPVTPNTLPNYQSSSSTSALSNGFYH FGSTSSSPPISPASSDLVAGSLPDTENDASPSFGLH PSPVHVCTEESLMSSLNGGSVPSELDGLDSEKDK MLVEKQKVINELTWKLQQEQRQVEELRMQLQKQ KRNNCSEKKPLPFLAASIKQEEAVSSCPFASQVPV KRQSSSSECHPPACEAAQLQPLGNAHCVESSDQT NVLSSTFLSPQCSPQHSPLGAVKSPQHISLPPSPNN PHFLPSSSGAQQGEHRVSSPISSQVCTAQNSGAHD GHPPSFSPISSSLHPPPSGAQADSSHGAGGNPCPK SPCVQQKMAGLHSSDKVGPKPSIPSPTEFSKSSSAIS EVTQPPSYEDAVKQQMTRSQQMDELLDVLIJESGE MPADAREDHSCILQKVPKIPRSSRSPTAVLTKPSAS FEQASSGSQIPFDPYATDSDEHLEVLLNSQSPLGK MSDVTLLKIGSEEPHFDGIMDGFSCKAAEDLENA HEILPGPLSPMQTQFSPSSVDSNGLQLSFTESPWET MEWLDLTFFNSTPGESALTSSPSIFNIDFLDVTL NLNSSMDLHLQQW
70	ARNm humano de alfa-SMA	

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CTCTCCCOGCCCCCGGGGCGCGCACTCA CCCACCCGCCCGAGCGAACCTTGGCTGGC TTGTCAAGGCTTGTCCAGGAGTTCCGCTCTCTC TCCAACCAGGGTCCCCCTCCAGCGACCCCTAAAG CTTCCCAGACTTCCGCTTCAATTCTGTCCGCAC CCCAOGCCCACCTCAACGTGGAGCGCAGGGTC TCCGAGGAGCGCCGAOCTGCCCGCCGTGCCA GCGGGTCAGCACTTCGATCAAGGCCAAGA AAAGCAAGTCTCCAGCGTTCTGAGCACCCGGG CCTGAGGGAAGGTCTAACAGCCCCCGGGAGC CAGTCTCCAACGCCCTCCCGCAGCAGCCGCC TCCCAGGTGCCCGCTGCCGCCGTGCCGCC ATCCCCCACCGCTCCCGCQCCCGCCCACTTGT CCTATCCCCGGGACTAAGACGGGAATCTGTGA AGCAGCTCCAGCTATGTGTGAAGAAGAGGACA GCACTGCCTTGGTGTGTGACAATGGCTCTGGC TCTGTAAGGCCGGCTTGCTGGGACGATGCTC CCAGGGCTGTTTCCCATCCATTGTGGGACGTC CCAGACATCAGGGGCGATGGTGGGAATGGGA CAAAAAGACAGCTACGTGGTGAACGAACACA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GAGCAAAAGAGGAATCCTGACCCCTGAAGTACC CGATAGAACATGGCATCATCACCAACTGGGAC GACATGGAAAAGATCTGGCACCACTCTTCTAC AATGAGCTTCGTGTTGCCCTGAAGAGGCACTCCC ACCTGTCTACGGAGOCACCCCTGAACCCAAG GCCAACCGGGAGAAAAATGACTCAAATTATGTTT GAGACTTCAATGTCCCAGCCATGTATGTGGCT ATCCAGGGGGTGCCTCTCTCTATGCCTCTGG CGCACAACTGGCATCTGCTGGACTCTGGAGAT GGTGTACCCCACAATGTPCCCCATCTATGAOGGC TATGCCCTGCCCTGCCATCATGCGCTGGAT CTGGCTGGCCGAGATCTCACTGACTACCTCATG AAGATCTGACTGAOCGTGGCTATTCCCTCGTT ACTACTGCTGAGCGTGAGATTGTCCGGACATC AAGGAGAAACTGTGTTATGTAGCTCTGGACTTT GAAAATGAGATGGCACTGCCATCTCCATCC TCCCTTGAGAAGAGTTACGAGTTGCCCTGATGG CAAGTGATCACCCTCGGAAATGAACGTTCCGC TGCCCCAGAGACCCCTGTTCCAGCCATCTTCATC GGGATGGAGTCTGCTGGCATCCATGAAACCACC TACAACAGCATCATGAAAGTGTGATATTGACATC AGGAAGGACCTCTATGCTAACAAATGTCTATCA GGGGCACCACATGTAACCTGGCATTGGCGAC CGAATGCAAGGAGATCACGGCCCTAGCACC CACGACCATGAAGATCAAGATCATGGCCCTCC GGAGCGCAAATACTCTGCTGGATGGCTGGCGCTC CATGCTGGCTCTGTCACCTTCCAGCAGAT GTGGATCAGCAAACAGGAATACGATGAAGCG GGCCTTCCATTGTCACCGCAAATGCTTCTAAA ACACTTCTGCTCTCTCTGCTCTAGCACACA ACTGTGAATGTCTGTGGAATTATGCCCTCAGT TCTTTGCAAAATCATCTTAGCCAAAGCTCTGAC TCGTTACCTATGTGTTTTTAAATAAAATCTGAAAT AGGCTACTGGTAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA
71	ARNm humano de MYOCD	AATGGCCGGCAGCCTATGACATCAGACAOGAA CGCCTGGGATGCCGGGCTGCTCTGGCCAACCT CCGAGGGAGGAGGGAGGGTOCCGCCGCGTAAGAG TIAATTAGCCCCGCACGGCGAGGGGGGGAGGG GGAGTTCTGGGACACTGGCTGCCACTGTAC TCCTACCCAGGGGAGCTCACGGAGAGTTGGATG AATTCTGGGTTGTTAGCTGCGGTCAAGCTGGCT CCGGGAGGCTGTTGCTGGTGGAGAACAGGGG GCGCTGGCCAAGGGGACCAGCGGCTGCTGAG ACTCAACATGACACTCCTGGGTCTGAGCATTC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CITGCTGATTAGGAGCAAGTCAGATCAGTTT ACAGTTAACACTTCAACAAAGAAGGACCCAGG AACAACTGGCTAACCAAGGCATAATACCACCA CTGAAACGTCCAGCTGAATTCCATGAGCAAAGA AAACATTTGGATAGTGACAAGGCTAAAAAATTCC CTGAAGCGCAAAGCCAGAAACAGGTGCAACAG TGCCGACTTGGTTAATATGCACATACTCCAAGC TTCCACTGAGAGAGGTCCATTCCAACTGCTCA GATGAAAGCTGAAAAGAGGCCGACTGCCGATG ATCTCAATGAAAAAAATTGCTCTAOGACCAAGGGC CACTGGAGCTGGTGGAAAAAAACATTTCCCTG TGGATTCTGCTGIGAAAGAGGCCATAAAAGGTA ACCAAGGTGAGTTCTCCAATTCACOGATGCTT TTOCCTTTGAAGAGGGACAGCAGCAGCGATGG CTTCTCCGATCAGACTCGAAGTGAAGAACCCC CAAAACTCAGCGGGATCCCCGCCAGACGCTAA AGCCTCAGATAACCOCTTCGACAGGTCTCTGGG GACAAACCAGGATCTTCTTCTGGCTCAGAAAAA TGACAGAAATGACTCAGCCTCACAGGCCAGCCA CCAGTCAGATGCCGGAGCAGGGCTTGGCC CCCCAGCACCCCCATAAGCCGTGATGCTGCTG TAAAGTCCAATCCTGCGTGAACAGTAAGAACCC GCCACAAAAAGCCCAGGGACCCAAAGCCAAAG GTGAAGAAGCTTAAATATCACCGATACATTCCC CCAGACCAGAAOGCAGAGAACGCTCCACC TATGGACTCAGCCTACGCTCGGCTGCTCAGCA ACAGCAGCTTCTGCACTCCAAATCCCTAG CCAGCAGCAGCAGCAGCAACACCGATTCA GCTACCTAGGGATCACCACAGCTCAGCTTAAGG AACCAAATGAAACAGATGGTCAAGAAATCCAAAC TCTCTTCAACGCCACTGAGCAATACCCCCCTGT CTCCTGTCAAAAACAGTTTCTGGACAAACTG GTGCTCTTCTTCAAAACAGGCCACTCCACC TAACCTGGATGATCTGAAAGGTCTCTGAATTAAAG ACAACAGCTTCAATTGGGGCTTGGCTGTGTC AGGCACCAAAACCGCTCTCATGGACGGCTTCG ACOCTTCCAGGACTGCTCTGGCAACCCAGTGCC GAACCTTGGGGATATAACGACTGTCACCTTCTC TGTCAACACCCAAACACCGCTCCAAATTACCAAGTC TTCCTCTTCTACCAAGTGCCTCTGCTCCAACGGCTTC TACCACTTGGCAGCACCAGCTCCAGCCCCCG ATCTCCCCAGCCTCTGACCTGTCACTGATGCC GGTCCCTGGCGGACACCTTCAATGATGCC CCTCTTCTGGCCTGCACCCGCCCCAGTCCACG TGTGCAAGGAGGAAAGTCTCATGAGCAGCCTG

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AATGGGGGCTCTGTTCCITCTGAGCTGGATGGG CTGGACTCCGAGAAGGACAAGATGCTGGTGG GAAGCAGAAGGTGATCAATGAACCTACCTGG AACTCCAGCAAGAGCAGAGGCAGGTGGAGGAG CTGAGGATGCACTTCAGAACAGAAAAGGAA TAACTGTTAGAGAAAGAACGCCGCTGCCCTTC GGCTGCCTCCATCAAGCAGGAAGAGGCGTCTC CAOCTGTCCTTGTGATCCAAGTACCTGTGAA AAGACAAAGCAOCAAGCTCAGAGTGTCAACCAC CGOCTTGTAAGCTGCTCAACTCCAQCCTCTG GAAATGCTATTGTGTTGGAOTCCTCAGATCAA CCAATGTAATTCTTCACATTCTCAGCCCCCA GTGTTCCCTCAGCATTCAACCGCTGGGGGCTGT GAAAAGCCCACAGCACATCAAGTTGCCCTCATC ACCCAAACAACCCCTCACTTTCTGCCCTCATCCTCC GGGGCCCAAGGGAGAAGGGCACAGGGTCTCCTC GCCATCAGCAGCCAGGTGTCACTGCACAGA ACTCAGGAGCACACCGATGCCATCTCCAAGCT TCTCTCCCCATTCTTCAGCCTCCACCCGCCCT CTCTGGAGCCCAAGCAGACAGCAGTCATGGTGC CGGGGAAACCCATTGTCCTAAAGCCCATGTTG ACAGCAAAAGATGGCTGGTTACACTCTCTGA TAAGGTGGGCCAAAGTTCAATTCCATCCCC AACTTTCTAAGTCAAATTCAAGTCAATTTCAGA GGTAACACAGCCTCCATCCATGAAAGATGCCGT AAAGCAGCAAATGACCCGGAGTCAGCAGATGG ATGAACCTGGACGGTCTTATTGAAAGCGGGAG AAATGCCAGCAGACGCTAGAGAGGGATCACTCA TGTCTTCAAAAAGTCCCAAAGATAACCCAGATCT TCCCGAAGTCCAAC TGCTGTCTCACCAAGCCC TCCGCTTCCTTGAACAAGCCTTTCAGGCAGC CAGATCCCCCTTGAATCCCTATGCCACGGACAGT GATGAGCATTGAAAGTCTTATTAAATGCCAG AGCCGCCCTTGAACATGCCACAGCTTCTCA CCCTCTTCTGTOGACAGCAATGGCTOCAGTTA AGCTTCACTGAATCTCCCTGGAAAACCATGGAG TGGCTGGACCTCACTCCGAAATTCCACACCA GGCTTAGCCCTCAACCACAGCAAGCCCCAGC ATCTCAACATCGATTCTGATGTCACIGATC TCAATTGAAATTCTTCCAATGGACCTTCACCTGCA GCAGTGGTAGAATGCCAATGCAACCAAGTGTAT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGAAGACCAATGGAGTTCATGGGGAAAGCA CACAGCCATACATACTTTACTGTCCAAAAACAG AAGAAGAAGAAGAGAATTAAAAAGAACGCAATG ATTTCTGTGCCAATGAAACAAGAACAAAGTCAT TTTAGAAATACATATACTGAAATATITACCAA CAAGTCAGTAACGTGTTAATGATTCAACAATGCA TTAAAAGAAATGTGCTTCTCAGATTAAAGGATGC CAAAAAGATAATTCACGTGCCTTTCAAGACCC AGTATAATTTCTAGCCCCATAATTTTCTCAGGCA TTGTTGGOGCATAAQCTCACACTGTAAGCTTT CTCATGAATTCACTAGACATAACGTOGAAGGAA AACGTAGTCTTGGGAGTACAGGGAAAGCCAGC CCCTCAAAGCTTATGGAAGACATAACCTGCAATG GAAGCTGTTGCCAATGTCCTCATTACTATCTTT CAAAAGAGAAGCCAGACCCAGCTCAGATCAA AAAGTTCCTGAGACAGAGGAACAAACCAATG ATTCCAGGGAAGCTAATCAACTCTCTTCTCCT CTACCACAAAACGCCCCCTGCTGGAGTGGTCTG AACCTGTAACCAGGACTCGATGTOGTCACTAAT AACAAATTAACTGAACGTGAGTCCACAGAACTCC ACTCGGAACCTCTCTTTTAACTIAGTGGCCC AAATCATTCCCACCATCTCTGCTGATAAGTAC GTGTCCTAGATGAGAACCCCTGAAAGAATGCA CCTCTTCCCCCGAAGGAGATGCCACAAGCTCT CCAACACAGCCCCCTTGTAGTCCAAAGACTAGA GATGACCACATTGGTAGAAGTATATCTCGAGGC ACAGGAAGGGAGCCCCACCCAGGGATAATTCA ACAGGACTAGAGAATAACATCATTTCACATACC CTGGGATAAAACACCCCTGGGTTCTATAGAAGGA CTATTACITATGGAACTCCAACCTCTCCCTTGT TTTGTATTATCAGTTATCTCTCTCCACCTCCA CTTTCTTCAAGGTACCAATCTCTCTGTTCC TGGTTTGGCCTCTCTCTCTGCTCCACAT TGGGAGGGAGGGACTCTCAGTTCTAACAAAGCT GCCATACTCTAACGAAAGCCATTGGAAAGAAAT TTAACAAATCCAGGTCTCTGAGAACACTCATT TCCACACGGCACAGTTGCTGCAAAAGGAAGTIG CAAGAATTCCTGAGGAAGAAACTGGTGACTTIG GTCCATCACTCACGAAGTCTCTCTAACAAAGCT TAGTTTCAAGAAATTATTGGTTTGTGTTGCTCT GGGGAAATTGGAAATCATTACATTGTAAGAC AAATATGGATGATATTACAAGAGAGAACGCA GATCTGGGTTTGTAAAGAAAACAGAACATGCGC ATTGAAAAACGATGCAAGGAAAAAGAACAAATGGT CTAATGTGCACTCCTCATTACCTCTCGTGGCTT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGCTGGGAGTTGGAAAAAGCTAAAATTCTAGA ACAGTCTCTGTAAGGCTCTCTGTOGCTCCAGTT CACCATTATATTGTGCATGCTGTAAGAAAGG AOGTATTGCTGTTGTTGTTTATTAAAT CACTAAGGACTGTTTATCTTTTGTAaaaaaaa AAAAAAAAAGTTGTTCACTGTGCACTTATAGAA AAAATAATCAAAATGTTGGGATTAGAAGCT CTCTTTGATAAACCAAAGATTAGAACGTCAT TCCATTGTTAACCTGTAaaaATGTGTGAACACA GAGAGTTTGGTGTGATTGCTACTCTGAAAGCTG CCAGATCTTATTCTGOGGGTGGATGTGGAGGA ATACACATACACACACAAACATACATGTAIGTA TAATAGATATATACATATGTTATATTATATCT GTGTGLOCATGTATCTCCAAAAGCGGGTTACA GAGTCTCACACAAAAGCCTTAAACCTTAATC TGCTGTGAATGATACTGGCCTTCTCACTATG AATTCTGATTAACCAACCAGACTACACGTTGC CTCTCTGTGTATGACTAACGGCTCCAACCCGAT GACTCACAGCTACTTGCTTATCGTQAACAAGCT CATCTGGCAATGAATATGGATOTGAAAAGACA GAACAGCTCACCAATTAGTAGCTGGAAATGGTA TCACAGTCTTATAGAGGAATATGAAAAGGAAC AAGAAAATCATTTACATTCCCTTATCTGTATT GTGCTTTAAAGATCCACATGGTAAATTTTTA TTTGTCTTATGTCAGTCATCAGAACCAaaaaa AATCCAGAAGAAAAAATGCCAGTGTCTTCTT GAAGATGAAGCTACTGGGAAGAAAACCTTAT TAATACACTCCACACATTGTTCATTCUTCACT GTTGOTGTTTCTTGUGGGTCTTGACAAAGCTTGC TGOTCAGTGCACTTTCAGGTGTACOTTGCT GTTGTATGTTTCTTCCOCCTTACITCTTGG AAAACAACACAGTGCCTTACTCTGAGA CCTGGACTGACTGTAATTATTTCTTCTTGG TATTCTATCTGAGAGACTAGACCTAGTTAGGA GGCCTCTGTACTCTCCAGATTGTACCTTTAT GGGGATCTTGAGGCTATGACCCAGGACTGATA GATATGCCTAACGGAAAGACAAAAGATAAAATG GTCCTATATCTTAATGCAAACCAACACAGTTA AAAGAGCAGATCTCTGGATAACTOCTCTCAACC TGCTCTACAGTCTCCACAAACCCOCATTCACCC TCTCTCTCATAGCTCAGACATGAAATTGAGG GAGAAAACCTGGAGATAATTGGGAGAAAATIGA TGAAGTGTGCTGCTCCAGTAGATCAAGATAATC CATGAAATTGCTCCATTGAGAATTATTTA AATTCTTAAACTCTCGTGTGTCTTGTGA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TGACAAATCAGGCATGACTAAAAGATGTACAG AGACTTACGAAGATGGTCACATTCAAGCTCCCT AATGCTCTTAGAACCTGAAGATGACCATGTGTA GTTTCTTAAGACCTCTGAACCCCCATGGTGAT GAAQACTTGAAGACATTGCAAGCTATCTGCTGC AGTCTGGTAGATTCACTTATCTAAAGAAGTC AAAAAAATTATTCTGCAAGTGTGCAAGGAAG CCAGTGCTTATTAGTAGTGAACCTGCTCTATCA ACGTTATTGAGACAACACATATTCTATTCTAAG GGAGAAAGAGGGAGGAAGAGAGGGAGGGAGG GAGGAAGAAGAGGGAGGGAGCGAGGAAGGAA GATAGGAGATGGGTAGGGGGTAAAGAGAAAAA GGAGGGAGAAGGGAGGAAGGAAAGGAAAGAGA GGAAAGAAAGGGAGGAAGGAAAAAGGGCCA AACTTCTGATCTATGAACTTCTCAGTCAGCTG TCACATTATGAGAAAGTAAATCAGAATTTTTA AGGAGAAAGTCATTCTAGCACTACAATAATTGT ACCACTAATTGAGGAAACCAAGACAATCTTCAC CTGAATAATAGAGGGTCTGAGAACTGTCAGGCT TTGCCATTCAAAAACATTATGTCCAACCTGA AAAAAAAGCATCAATAAAACCTATCCCAGCA TTCAAAATAGCTCTTCAAATGTTATTATT AAAGTCATCAGCTCTTAAAGAACAGATTCTG GTCTGGCTGAAAACCTCCCACAACAAATTACTC ATCCAGTGCTAATATTAAATGCCCACCATGGG CAGAGCACACAAATCTCAGATAAACAAACTG AATTGATTAGCAGACAGATTGTCAGATTGAAAT GACCAGGGAGTTGTATTGACATGCAAGAAC CTAAGAAATCTCCAGTCCTCAAAACTAGAAACCT TTCAGCTACGATGAAAAAAGGGGTCTT CATTTTCCAAGAGGGGGTGGAGGTGGGGATCA CTTTTAGCTAAAAGCTATCTCTCACTTCAAAAT TCTGTCTTTCTTGTGACAAACACCAAGTAG TCTATCACTGGAGATCTTTAAATATCTCCCAC ATTAAAACATCCACGAGAGTTGAAGATTGT GTGATTGCCAGATACAGAACGCCCTTGAAAAT AAGGAAAGGGTGGAGGAAGCATTGGTGTCT ATCCCTACTTATCGTAGCAGCTCTATAGACAAA AGGGACACTTACTGGTGAOCCTCTGGCCCTAA AAGAAAATCATCTAAAGAATATGAAGGCAATT GATTCCCCCCCACAGCCCTCAGCTGCCCTCCTC ACAGAAGGAAGTCCAAAATTGCTGOTACAC AGTTGCAATCAAATATCAGATATGAGAAAACC TGTAGTGAAGAGTCTGGGTTCTGGTTTTCTCAT AAATCCAATATAAATTGTAGGTTGGTCAAGGG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TCAAAATTGCCAGTGCTTATTAGACAGATGAT ACTGATAGACACACAGAGCCCAGGTCTGGAA CAAGACAATCCTGTAOTGCCAAGATCTGGTCAG TTGGTTAACGGAGCTGGGTTTGATTCTAGAGTC CAGGTTATAGAGAAACCCCTGGCTAGATTGAGC CTACCCATGGGAGACGATTCAAGACAGGAT GAGATCTGGAAAGAATTTCGTGTATCTGCCA GGGAAATTATCACAGGACTCATTGAATGCAATA ACATGTGAGTAAGTCCCTTTGATTCTGGAA TCAQCGATTTCCTCTGTOGATTAAGACAAACCA ACGCCAGAAGGTCTCTGCTTATTAAACCA TCTGCTCCCATCGTGAACCTGGAGCATGCATT TCTAGAAGTGGTTTCATAGCTCTGTGTGTTCA TGGAAAAGGGAGTATAATGATGGGATGCTG GAAGCTTTTAATGTTCCAAAGGAAAGGAA CCCACACTGCTCCCCAGAGTTCCTTCCAATGG CCCTGCAGTAAGAACGGAGGACAATGATTGCT GGGTGCTTAAATGCTCCCTCAGTGAAGCACAA AGAGACACTTTGTAAGAAAAAGAGCAAGC ATAGGTCTCTGTGGGACCTGTGGAGTGGTGT TTTCAGGTGGCTCTTGGCTCAATTGAGCATA ATCAGAAAGAAATGCTGGTATTGGAAAGAGA CAAAAGCACTGGCTAAATACCAAAGTGGC ATGTGTTCTTTTAAAGAAAAAAATGCA TATTTTAAATAAAATGTTATTTAAAG AAAAAA
72	Proteína humana BSAP	MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQ ETLKYLELQLNTNVAKNIVMLGDGMGVSTV TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTY NTNAQVFDSDAGTATAYLGVKANEVTGVSAAT ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAKSVGIVTTTR VNHATPSAAYAHSADRDWYSNDNEMPPEALSQGC KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDV EYESDEKARGTRLGDLVDTWKSFKPRYKHSHF IWNRTELLTLQPHNVDYLLQLEPGDMQYELNRN NVTDSLSEMVVVAJQILRKNPKGFFLLVEGGRID HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIQQAGSLTSSED TLTVVTADRSHVFTFGGYTPRGNISIFGLAPMLSDT DKKPFTAILYNGNGPYKVVGGERENVSMDYAH NNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMALII HGVHEQNYVPHMAYAACIGANLGHCAPASSAG SЛААГПЛЛЛАЛАЛЫПЛСВЛФ
73	ARNm humano de BSAP	CCGGGGCTCACTCGGGGCCCCCGGGCCCTTTA TAAGGCGGCGGGGGTGGTGCCCCGGGCGCGT TGGCGTCCCCGCACTCCGCGCCCGCTATCCTGG

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CTCGTGCCTCCCACGGCTTGTGCCGGACGGA CCCTGCCAGTGCTCTGCGCAGGGATTGAAACAT CAGTTAACATCTGACCACTGCCAGCCCACCCCC TCCCACCCACGTGATTGCACTCTCTGGGCTCCA GGGATAAAAGCAGGTCTGGGQTGACCCATGATT TCACCAATTCTTAAGTACTGCCATTGGCACCTGC CTTACTAACTCCTTAAGTGCCAGAGAGAAAGAGAAA GACCCCAAGTACTGGCAGACCAAGCGCAAGA GACACTGAAATATGCCCTGGAGCTTCAGAAAGCT CAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTT CCTGGGAGATGGGATGGGTGCTCCACAGTGAC GGCTGCCCGCATCCTCAAGGGTCACTGCCACCA CAACCTGGGGAGGAGACCAAGGCTGGAGATGG ACAAGTCCCCCTCGTGGCCCTCTCAAAGACGT ACAACACCAATGCCCAGGTCTGACAGCGCC GGCACCCGCCACCGCCTACCTGTGTOGGGTGAAG GCCAATGAGGGCACCGTGGGGTAAOOGCGAGC CACTGAGCGTCCCGGTGCAACACCACCCAGGG GAACGAGGTCACTCCATCCTCGCTGGGCAAA GGACGCTGGAAATCTGTGGGCAATTGTGACCA CAGGAGAGTGAACCATGCCACCOCCAGCGCCG CCTACGCCCACTCGGCTGACCGGGACTGGTACT CAGACAACGAGATGCCCTGAGGGCTTGAGCC AGGGCTGTAAGGACATGCCCTACCAAGCTGATGC ATAACATCAAGGGACATTGACGTGATCATGGG GGTGGCCGGAAATACATGTACCCCAAGAATAA AACTGATGTGGAGTATGAGAGTGACGAGAAAG CCAGGGGCAAGGAGCTGGACGGCCTGACCTC GTTGACACCTGGAAGAOGCTTCAAACCGAGATA AAGCACTCCCACTCATCTGAAACCCACCGGAA CTCCGTACCCCTGACCCCCACAAATGTGACTAC CTATTGGGTCTCTCGAGGCCAGGGACATGCAG TACGAGCTGAAACAGGAACAAACGTGACGGACCC GTCACITCTCGAGATGGTGGTGGCGACATCCA GATCCTGCCGAAGAACCCCAAAGGCTCTTCTT GCTGGTGGAAAGGAGGCAGAATTGACCAACGGC ACCATGAAAGGAAAGCCAAGCAGGCCCTGCA GAGGCGGTTGGAGATGGACCGGGCCTGCGCA GGCAOGGCACTTGACCTCTCGGAAGACACTCT GACCGTGGTCACTGCGGACCAATTCCACGTCTT CACATTGGTGGATACACCCCCCGTGGCAACTC TATCTTGGTCTGGCCCCCATGCTGAGTGACAC AGACAAGAAGCCCTCACTGCCATCCTGTATGG CAATGGGCCCTGGCTACAAGGTGGTGGCGGTG AACGAGAGAATGTCTCCATGGTOGACTATGCTC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ACAACAACTACCAGGCGCAGTCTGCTGTGCC TGCGCCACGAGAGACCCACGGGGGGAGGACGTG GCGTCTTCCAAGGGCCCCATGGCGCACCTG CTGCACGGGTCCACAGAGAAGACTACGTCCCC CACGTGATGGGTATGCAAGCTGCATGGGGCC AACCTGGCCACTGTGCTCTGCCAGCTGGCA GGCAAGCTTGCTCAAGGCCCCCTGCTGCTCGG CTGGCCCTCTACCCCTGAQCGTCCTGTTCTGA GGGCCAGGGCCGGGCAACACAGGAGGGGGGG ACAGATGCCAACCTCCCACACGGAGGGGGGG CTCAAGGGGCAAGGAGGTGGGGCTCCCTCA CCTCTGCAACTGCAAGAAAGGGGACCCAAGAA ACCAAAGTCTGCCGCCACCTCGCTCCCCCTG GAATCTTCCCCAACGGCAAACCCACTTCTGG CTCCAGGCTTGTCTCCCTCCCCGCTGCCCTTGG CCAACAGGGTAGATTCTCTTGGCAGGCAGAG AGTACAGACTGCAAGACAATTCTCAAACCTCTTA TTTTCTAGCGAACGTAATTCTCCAGACCCAGA GGCCCTGAAGCTCCGTGGAACATTCTGGATCT GACCCCTCCAGTCTCATCTCCTGACCCCTCCCCACT CCCATCTCCTAACCTCTGGAACCCCCAGGGGG TACAATGCTCATGTCCTGTCCTGGGGAG CCTCCCTAGGGGAGTTGAAGGTCTTCTCTCA GGACAAGGCTTGTCACTCACTCACTCCAAGA CCACCAAGGTCCCCAGGAAGCCGGTGCCTGGT GGCCATCTACCCAGCGTGGCCAGGCCGGGA AGAGCCACCTGGCAGGGCTCACACTCTGGGCT CTGAACACACACGCCAGCTCTCTGAAAGCGA CTCTCCTGTTGGAACGGCAAAAAAAATTTTT TTTCTCTTTGGTGGTGGTAAAAGGGAAACA CAAAACATTAATAAAACTTCCAAATATTTC CGAGGACAAAAAA
74	ARNm de Snai1	ATTCAATTGCCGCCGCCACGGGCTAGCGAGTGG TTCTTCTGCGCTACTGCTCGCGAAATCGGCAC CCAGTGCCTCGACCACTATGCCCGCCTCTTTC CTCGTCAGGAAGCCCTCCGACCCCAATCGGAAG CTTAACCTACAGCGAGCTGCAGGACTCTAATCCA GAGTTTACCTTCCAGCAGCCCTACGACCAAGGCC CACCTGCTGGCAGCCATCCCCACCTCGGGAGATC CTCAACCCCCACCCCGCTGCCATGCTCATC TGGGACTCTGCTCTGGGGCCCAAGGCCAGGCC ATTGCCCTGGGCCCTCCCTCGGCTCCAGGAGAGT CCCAAGGGTGGCAGAAGCTGACCTCCCTGTCAGAT GAGGACAGTGGGAAGGCTCCAGCCCCCAG CCACCCCTACCGGCTCTCTGCTCTCTCCTCT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ACTTCAGTCTCTTCCCTGGAGGCCGAGGCCAT GCTGCCTTCCCAGGCTTGGGCCAAGTGCCCAAG CAAGCTGGCCCAGCTCTGAGGCCAAGGAATCTC CAAGGCTCGAAAGGCCCTCAACTGCAAATACTGC AACAAAGGAATAACCTCAGCCTGGGTGCCCTCAAG ATGCACATCCGAAGGCCACACGCTGCCCTGCC TGGCGAACCTGCCGGAAAGGCCCTCTCTAGGCC TGGCTGCTACAAGGCCATGTCCGGACCCACACT GGCGAGAAGCCCTTCTCTGTCCCCACTGCAGC CGTGCCTCOCTGACCGCTCCAACCTGCCGG CACCTCCAGACCCACCTCAGATGTCAAGAAGTAC CAATGCCAGGCGTGTGCTCGACCTTCTCCCGA ATGTCCTGCTCCACAAGCACCAAGAGTCGG TOCTCAGGATGTCCCCGCTGACCCCTGAGGCTC CCTCTTCTCTCCATACCTGCCCTGACAG CCTTCCCCAGTCCAGCAGGAAGGACCCACAT CCTCTCACTGCCATGGAATTCCCTCTGAGTGC CCCACTCTGCCACATCAGCCCCACAGGACTT TGATGAAGACCATTTCTGGTTCTGTGTCTCTG CCTGGGCTCTGGAAGAGGCCCTCCATGCCAT TTCTGTTGGAGGGAGGGCAGCTGGCCCCAGGCC TGGGGGATTCTGAGCTGGCTGCTGCGTGG TTTTGTATCCAGAGCTGTTGGATACAGCTGCT TTGAGCTACAGGACAAAGGCTGACAGACTCACT GGGAAGCTCCCACCCCACTCAGGGGACCCCACT CCCTCACACACACCCCCCACAAGGAACCC AGGCCACCCCTCACAGAGGTGACTAACTATGC AATAATCCACCCCCAGGTGAGCCCCAGGGCCT GGGGAGGCGGTGAGCTAGAGTCTGAGATG CCCCGAGCCCAAGCAGCTATTCAAGCTCTG TTGGTGGGGTGGCACCTGTTCCCGGCCATT AACAAATGCTGAAAAGGGACTGTGAGTAATGG CTGTCACCTGTCGGGGGCCAACGCGGCTGCTC TGCTCTGACCGATGTGTCTCCAGAACATTCT GGGGGCCCGACAGGTGGGCCCTGGGAGGAAGAT GTTACATTAAAGGTACACTGGTATTATAT TTCIAACATTTGTATCAAGGAAACGTTTGT TAGTTATATGTACAGTTATGATATTCAATAA AGCAGTTAATTATATATTAAAAAAA AAAAA
75	ARNm de Dkk1	GCAGAGCTCTGTGCTCCCTGCAGTCAGGACTCT GGGACCGCAGGGGGCTCCGGACCCCTGACTCTG CAGCCGAACCGGCACGGTTCTGGGGACCCA GGCTTGCAAAGTGAAGGTCAATTCTCTTCTT CTCCCTCTGAGTCCTCTGAGATGATGGCTCTG

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGCGCAGCGGGAGCTACCCGGGTCTTGTGCG ATGGTAGCGGCAGCTCTCGCGGCCACCCCTG CTGGGAGTGAGCGCCACCTGAACTCGGTTCTC AATTCCAACGCTATCAAGAACCTGCCCCCACCG CTGGGCAGCGCTGCGGGGACCCAGGCTCTGCA GTCAGCGCCCGCCGGGAATCTGTACCCGGGC GGGAATAAGTACCAGACCATTGACAACATACCA GCCGTACCCGTGCGCAGAGGAGCGAGGAGTGGG GCACTGATGAGTACTGCGCTAGTCCCACCCGCG GAGGGAGCGCAGGCGTCAAATCTGTCTCGCCT GCAGGAAGCGCCAAAACGCTGCAATGCGTCAC GCTATGTGCTGCCCCGGGAATTACTGCAAAAT GGAATATGTGTGCTTCTGATAAAATCATTTC CGAGGAGAAATTGAGGAAACCATCACTGAAAG CTTGGTAATGATCATAGCACCTTGGATGGTA TTCCAGAAGAACCAACCTTGTCTTCAAAATGTA TCACACCAAGGACAAGAAAGTTCTGTTGCT CCGGTCATCAGACTGTGCTCAAGGATTGTGTTG TGCTAGACACTTCTGGTCCAAGATCTGAAACC TGTCTGAAAGAAGGTCAAGTGTGTAACCAAGCA TAGGAGAAAAGGCTCTCATGGAACAGAAATATT CCAGCGTTGTTACTGTGGAGAAGGTCTGCTTG CCGGATACAGAAAGATCACCCTCAAGCCAGTA ATTCTCTAGGCTTCAACTTGTGAGAGACACT AAACCAAGCTATCCAATGCACTGAACCTCTT ATATAATAGATGCTATGAAAACCTTTATGACC TTCATCAACTCAATCTAAGGATATAACAAGTTC TGTGGTTTCAGTTAACGATTCCAATAACACCTT CCAAAAACCTGGAGGTGTAAGAGGCTTGTCTT TATGGAACCTCCCTGTGATTGCACTAAATTACT GTATGTAATTCTCAGTGTGCACTTACCTGT AAATGCAATGAAACCTTTAATTATTTCTAAA GGTGTGCACTGCCTATTTTCTCTTGTATGT AAATTTTGTACACATTGATTGTATCTGACTG ACAAATATTCTATATTGAACTGAAGTAAATCAT TTCAGCTTATAGTCTTAAAGCATAACCCCTTA CCCCATTAAATTCTAGAGCTAGAACGCAAGGA TCCTGTGAAATGACAATGATAGGTACCTAAAA TGTAAACATGAAAATACTAGCTTATTTCTGAAA TGTACTATCTTAATGCTTAAATTATATTCTCCCT TAGGCTGTGATAGTITTTGAATAAAATTAAAC ATTAAATATCATGAAATGTTATAAGTAGACATA CATTTGGGATTGTGATCTAGAGGTTGIGTGT GTGTACGTATGTGTGTCTACAAGAACGGAA GTGTGATATGTAAAGATGATCAGAGAAAAG
		ACAGTGTCTAAATATAAGACAATATTGATCAGC TCTAGAATAACTTTAAAGAAAGACGTGTTCTGC ATGATAAAACTCAAATGATCATGGCAGAAAGAG AGTGAATCTTACATTACTACTTCAAAAATAGT TTCCAATAAAATTAAATAACCTAAAAAA

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
76	ARNm de Colla1	TCGTGGAGCAGACGGGAGTTCTCTCGGGT CGGAGCAGGAGGCACGCCGAGTGTGAGGCCAC GCATGAGCGACGCTAACCCCTCCCCAGCCAC AAAGAGTCTACATGTCTAGGGCTAGACATGTT CAACTTGTGGACCTCCGGCTCTGCTCTCTTA GCCGCACCGCCCTCTGACCCACOGCCAAGA GGAAGGCCAAGTCGAGGGCCAAGACGAAGACA TCCCACCAATCACCTGCGTACAGAACGGCCTCA GGTAACCATGACCGAGACGTGTGAAACCCGAG CCCTGCCGATCTGCCGCTGCCGACAACGGCAAG GTGTTGTGCGATGACGTGATCTGTGACGAGACC AAGAACTGCCCGGCCGAAGTCCCCGAGGG CGAGTGCTCTCCGCTCTGCCCGACGGCTCAGA GTCAACCCACCGACCAAGAAACCACCGCGTCG AGGGACCCAAGGGAGACACTGGCCCCCGAGGC CCAAGGGGACCCCGCAGGCCCTGGCCGAGA TGGCATCCCTGGACAGGCTGGACTTCCCGACC CCCCGGACCCCCCGACCTCCGGACCCCCCTGG CCTCGGAGGAAACTTTGCTCCCCAGCTGTCTTA TGGCTATGATGAGAAATCAACCGGAGGAATTTC CGTGCCTGGCCCCATGGCTCCCTCTGGTCCCTCG TGGTCTCCCTGGCCCCCTGGTGCACCTGGTCC CCAAGGCTTCCAAGGTCCTGGTGAACCTGG CGAGCCCTGGAGCTTCAGGTCCTACGGTCCCC AGGTCCCCCAGGTCCCCCTGGAAAGAATGGAG ATGATGGGAAGCTGGA AAACCTGGTGGTCTG GTGAGCGTGGGCTCTGGGCTCAGGGTGGTCTC GAGGATTGCCCGAACAGCTGGCTCCCTGGAA TGAAGGGACACAGAGGTTTCAGTGGTTGGATG GTCCTGGAGATGCTGGTCTGGTGGTCTG AGGGTGAGCCTOGCAGCCCTGGTAAAATGGAA GCTCTGGTCAAGATGGGCCCCCTGGCTGGCTG GGTAGAGAGGOTGCCCTGGAGCCCCCTGGCCT GCTGGTGGTCTGGTGGAAATGATGGTGGTACTGGT GCTGCCGGGCCCCCTGGTCCACOGGCCCTGG GGTCTCTGGCTTCCCTGGTGGTGGTGGTCTG AGGGTGAGCTGGTCCCCAAGGGCCCCGAGGC TCTGAAGGTCCCCAGGGTGTGGTGGTGAACCT GGCCCCCTGGCCCTGGTGGTGGTCTGGCCT GCTGGAAACCCCTGGTGGTCTGATGGACAGCCTGGT

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GCTAAAGGTGCCAATGGTGCTCTGGTATTGCT GGTGCTCCTGGCTTCCCTGGTGCACGAGGCCCC TCTGGACCCCAGGGCCCCGGCGGCCCTCTGGT CCCAAGGGTAACACCGCGTGAACCTGGTCTCT GGCAACCAAAGGAGACACTGGTCTAAGGGAGA GCCTGGCCTGTTGGTCAAGGACCCCTGG CCCTGCTGGAGAGGAAGGAAAGCGAGGGAGCTC GAGGTGAACCCGGACCCACTGGCTGCCCGA CCCCCTGGGAGCGTGGTGGACCTGGTAGCGT GGTTTCCCTGGCGCAAGATGGTGTGCTGGTCCC AAGGGTCCCGCTGGTGAACCTGGTCTCCCTGGC CCCTGCTGGCCCCAAAGGATCTCTGGTGAAGCT GGTCGCTCCGGTGAACCTGGTCTGGTGGTCCC AAGGGTCTGACTGGAAGCCCTGGCAGCCCTGGT CCGATGGCAAAACTGGCCCCCTGGTCCCCGCC GGTCAAGATGGTCCCCGGTCAAGGCTGGTGTGG ACCTGGTCCCCGGTGGTCAAGGCTGGTGTGG ATTCCTGGACCTAAAGGTGCTGGTGGAGAGOC CGCGAACGGCTGGAGGAGCGAGGGTGTGG CCCCCTGGCGCTGGTGGTCTGGTGGCAAGATG GAGAGGCTGGAGCTAGGGACCCCCCTGGCGT GCTGGTCCCCCTGGCGAGAGAGGGTGAACAAGG CCCCCTGGCTGGCTCCCCGGATTCAGGGTCTCCC TGGTCTGGCTGGTCTCCAGGTGAAGCAGGCAA ACCTGGTGAACAGGGTGTCTGGAGACCTGG CCCCCTGGCCCCCTGGAGCAAGAGGGCGAGA GAGGTTCCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTC CCCCCTGGCTGGTGGTCTGGGAGGGGCCAAAG GTOCTCCCCGCAAGGATGGTGTCTGGTGGTGG CTGGTCCCCCTGGAGCTGGTGTGGTGGTGG CCCCCTGGCGCTGGAGGAAATGGTGTGGTGG GTGCAAGCTGGTCTTCCAGGGCTAAGGGTGACA GAGGTGATGGTGGTCCAAAGGTGCTGGTGG CTCCTGGCAAAGATGGTGGTGGTGTGACTG GCCCATGGTCTGGTGGTGGCCTGGTGTGG CTGGTGACAAGGGTGAAAGTGGTGGTGG CCTGCTGGTCCCAGGGCTGGTGGTGG GGAGACCGTGGTGAAGCTGGTCCCCGGCG GCTGGCTTGGTGGCCTGGTGGTGGTGTGACGG CAACCTGGTGTAAAGGCAACCTGGTGTGG GGTGTAAAGGCGATGGTGGTCCCCGGCG GCCGGACCCGCTGGACCCCTGGGGCG AATGGTGGTGTCTGGTGGTGGTGGTGG GGCAGCGCTGGTCCCCCTGGTGGTGTGG CCTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CCCCCTGGAAATGCTGGACCCCTGGCCCTCT GGTCTGCTGGCAAAGAAGGCGGCAAAGGTCC CCGTGGTGGAGACTGGCCCTGCTGGACGGCTCQG TGAAGTGGTCCCCCTGGTCCCCCTGGACGGCTCQG TGCGAGAAAGGATCCCCCTGGTOCTGATGGTCC TGCTGGTGCCTGCTGGTACCTCCGGGCTCAAGG TAITGCTGGACAGCGTGGTGTGGTCGGCTGCC TGGTCAGAGAGGGAGAGAGAGGGCTCCCTGGTCT TCCCCTGGCCCTCTGGTGAACCTGGCAAACAAGG TCCCCTGGAGCAAGTGGTGAACGGTGGTCCCCC TGGTCCCCATGGGCCCCCTGGATTGGTGGACCC CCCTGGTGAATCTGGACGTGAGGGGGCTCTGG TGCGAAGGTTCCCCCTGGACGAGAGACGGTCTCC TGCGCCCAAGGGTGGACCTGGTGGAGACCGGCC CGCGTGGACCCCCCTGGTGTCTGGTGTCTGG GTGCCCCCTGGCCCCGGTGGCCCTGCTGGCAAGA GTGGTGAATGGTGGAGACTGGTCTGCTGGTCC CGCGCGTCTGGTGTGGCCCTGGTGGCGGGCTG GCCCCGGGGACCCCCAAAGGCCCCGGTGGTGA AAGGGTGAAGACAGGGAAACAGGGCGACAGAGG CATAAAAGGTCAACCGTGGCTCTCTGGCTOCA GGGTOCCCCCTGGCCCTCTGGCTCTGGTGA ACAAGGTCCTCTGGAGGCTCTGGTCTGCTGG TCCCCGGGGTCCCCCTGGCTCTGGTCTGGTCT GGCAAAGATGGACTCAACGGTCTCCCCGGCC ATGGGGCCCCCTGGTCTCTGGTCTGGGCTACTGG GATGCTGGTCTGGTCTGGTCTGGGCTCTGG GGACCTCTGGTCCCCCTGGTCTCTGGTCT GGTGGACTTCAGCTTCTGGCCAGGGCACCTC AAGAGAAGGCTCACGATGGTGGCCCTACTAC CGGGCTGATGATGCCAATGGTGGTCTGACCCT GACCTCGAGGTGGACACCACCTCAAGAGCTG AGCCAGCAGATGGAGAACATGGAGGGCAGA GGCGAGGGCAAGAACCCCCGGCGCACCTGCC GTOACCTCAAGATGTGCCACTCTGACTOGAAGA GTGGAGAGTACTGGATTGACCCCAACCAAGGCT GCAACCTGGATGCCATCAAAGTCTCTGCAACA TGGAGACTGGTGAAGACCTGGTGTACCCCACTC AGCCCACTGGTGGCCAGAAGAACCTGGTACATC AGCAAGAACCCCCAAGGAAACAGAGGGCATGTCTG GTTCGGCGAGAGCATGACCGATGGATTCAGTT CGAGTATGGCGGCCAGGGCTCCGACCCCTGCCGA TGTGGCCATCCAAGCTGACCTTCTGGCCCTGAT GTCCACCGAGGGCTCCAGAAGAACATCACCTACCA CTGCAAGAACAOCTGGCTACATGGGACCAGC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AGACTGGCAACCTCAAGAAGGCCCTGCTCTCC AGGGCTCCAACGAGATCGAGATCCGCCCGAG GGCAACAGCCCGTTACCTACAGCGTCACTGTC GATGGCTGCACGACTCACACCCCGAGCCTGGGG CAAGACAGTGAITGAATAACAAAACCACCAAGA CCTCCCGCCATCATCGATGTGGCCCT TGGACGTTGGTGCCTCAGACCAAGGAATTGGCT TGGACGTTGGCCCTGCTGCTTCTGAAACTCC CTCCATCCAAACCTGGCTCCCTCCCACCCAACC AACTTTCCCCCAACCCCGAACAGACAAAGCA ACCCAAACTGAACCCCCCTCAAAAGCCAAGAAA TGGGAGACAATTACATGGACTTGGAAAATA TTTTTTCTTGCATTCATCTCTCAAACCTAGTT TTTATCTTGTACCAACCTTACCAAAAAAAA AAAAAAAGAATAAAATAAAACTTTTAA AAAGGAAGCTGGTCCACTTGCTGAAGACCCA TGCQGGGGTAAGTCCTTCTGCCCCGGCTGGCT TATGAAACCCAATGCTCCCCCTCTGCTCTCTT CTCCACACCCCCCTGGGGCTCCCTCCACTC CTTCCCAAATCTGTCCTCAGAACAGAACAGGA AACAAATGTATTGTCTCCAGCAATCAAAGGA ATGCTAAACACCCAAAGTGGCCCCCACCTCAG CCCGCTCTGCCGCCAGCACCCCCAGGCGCT GGGGGACCTGGGCTCTCAGACTGCCAAGAA GCCCTGCCATCTGGCTCCATGGCTTGCA ACATCTCCCCCTCTGTTTGAAGGGGCTATGCC GGGGGAGCCACCAGCCCCCTACTGGGTTGG GGAGAGTCAGGAAGGGCCACGACAAGCAGAA ACATCGGATTTGGGAAACCGGTGTCAATCCC GTCCTGGCAGGGCTGGCGGGAGAGACTGTTCT GTTCTTGTGTAACTGTGTTGCTGAAAGACTAC CTCGTTCTTGTCTTGATGTTGACCGGGGCAACT GCCCTGGGGCGGGGATGGGGCAGGGTGGAAAG CGCGCTCCCATTTATACCAAAGGTGCTACATC TATGTGATGGTGGGGGGGGAGGGAAATCACT GGTGCTATAGAAATTGAGATGCCCGGAGGCC AGCAAATGTCCTTCTGTCAGTCTATTTT ATTCCTTGATTTCTTTCTTTTTTTTTTT GTGGATGGGGACTTGTGAATTCTAAAGGTG CTATTTAACATGGGAGGGAGAGCGTGTGGGCTC CAGCCCCAGCCCGCTGCTCACTTCCACCTCT CCACCTGCCCTGGCTCTCAGGCCCTGCTCTC CGACCTCTCTCTCTGAAACCCCTCCACAGC TGCAGCCCCATCTCCCGCTCCCTCTAGTCTGT
		CCTCGTCCTCTGTCCTGGGGTTCTAGAGACAA CTTCCTAAAGCACAACAGCAGTTTCTCCCTAG GGTGGGGAGGAAGCAAAAGACCTCTGACCTAT TTTGTATGTGTTGATATAAAATTGAGATGTTTAA TTATTTGATTGCTGGAATAAAAGCATGTGGAAA TGACCCAAACATAA.

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
77	ARNm de activina A	ATGCCCTTGCCTGGCTGAGAGGATTCTGTG GCAAGTTGCTGGATTATAGTGAGGAGTTCCCC ACCCAGGATCCGAGGGOCACAGCAGCGGGCCC CGACTGTCGGTCCCTGTCGGCTGGCGGCCCTGG AAAGGATGTACCCAACTCTCAGCCAGAGATGGT GGAGGCGTCAAGAACGACATTTAACATGCT GCACTGAAGAAGAGACCCGATGTCACCCAGC CGGTACCCAAGGCCGGCTCTGAACCCGATCA GAAAGCTCATGTCGGCAAAGTCGGGAGAAC GGGTATGTGGAGATAGAGGATGACATTGGAAG GAGGGCAGAAATGAATGAACCTATGGAGCAGA CCTCGGAGATCATCACGTTGCCGAGTCAGGT GGTGCCTGGCATTGGCAGGGGGTGGGGAGGGT GGGGGGTGGGAGGGTAAAATAATTCTTGCAC AGTCCCAGGAOGAACCTCTTCCCTCAAGCTG GAAACTGCCTGGGAAGGTATEAGTATTAGGT GATGGTAGCGGACTAGCCGACGGAGGGCAGGC AGGGGAGGGGGAGAGGACTTACAGAAAAGGA ATTCTCGGTGAGCTCTGCTGGAGATGACTGG CTTACACTTAACCCAGCGGGTACACAGA GAGGAAGCTCGGGCAATGTTGAGCTGGAG GCAGACTGTGAGGGCTGCCTGCCCTGCCTGT GAAACAGATCTGAGCAGCCGGAGGAAGCCGC GGCATTTTGGGTOCTAGGGAGCAGAGGGAGG CTTCCGGACCCATCCAAGTCTTATGAGG AGAGGGGGAATGTAACCAAGGATTGGAGTGGAA TGGCACAGATGAAGTCACTCTTAAACAAAC CTTCCCTTTAAAGTCCAATCTGGGCCACAT TGGAGAACGAGGGCATATTATGAGTGAACAGTC ATTTTACCTTAAAGAAATGCTTAAACTGCAC AGGCACCACATTCAAGACAOGGAAGAGCTACT TTGGGGACACTGACTTTGCTCTGAAAGAA AAAAAAATAAAATAAAACAACCAGTTTGTCTT TCTAAAGTTACTAAGAGCTCTGCAAGGAAC GAACCTTGACAAAGTACTCTCAGATACTACGCT GAAGTCACTCAATCTTAAAGAGGAAGAAG
78	Cebador 1 de Snai1	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA
79	Cebador 2 de Snai1	AGATGAGCATTGGCAGCGAG
80	Cebador 1 de Dkk1	CCTTGAACCTGGTCTCAATTCC
81	Cebador 2 de Dkk1	CAATGGTCTGGTACTTATTCCCG
82	Cebador 1 de Colla1	GAGGGCCAAGACGAAGACATC
83	Cebador 2 de Colla1	CAGATCACGTACCGACAAC
84	Cebador 1 de activina	TCATCACGTTGCCGAGTCA
85	Cebador 2 de activina	GCTAGTCCGCTACCATCACC
86	ARNm humano de Axin2	

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ACTGGCTCCCGAQCCTGQCCCGGGGAGTCG GCTGGAGCCGGCTGCCTTGTATAAGGTCTGG CAACTCAGTAACAGCCCAGAGAAGCCGGAAATA AAAATAACCCCTCAAGAGCGATGGATTTCGGGGC CGCCCCGGCGGGCGAGGCAGCCCGCGAAGGCC TGCTGTAAAAGAGAGGGAGGTTCAGATGAGGCC CTGCTGACTTGAGAGAGACAGAGAGACCACGC CGATTGCTGAGAGGAACCTGGAAGAAGAAAAAT TCCCAGACTCACTGGAAAGAAGACTCOCTCACCAT GAGTAGCGCTATGTTGGTGAECTTCCCTCCGGAA CCCCAGCAAGCAGCTTCCGTGAGGAATCCCCOCG GCCCOGAGTGCCAGGGGAAGAAGGGAGACCC CACCGTGTAGCCAGGGTGGGCAAGGGCCAG GTCAACCAAACCCATGCCTGTCTCTTCCAACACC AGGCGGAACGAAGATGGTTGGGGAGCCCGA GGGGCGGGCATCTCCGGATTCCCTCTGACCCG GTGGACCAAGTCCTAACACTCCITATTGGCGA TCAAGACGGTGTACCTGTTCCGAACCTTCT GGAGAGGGAGAAATGGTGGATACCTTAGACT TCTGGTTTGCCTGCAATGGATTCAAGGAGATGA ACCTGAAGGATACCAAAACTTACGAGTAGCCA AAAGCGATCTACAAAAGGTACATTGAGAACAAAC AGCATTGTCCTCAAGCAGCTGAAGGCTGCCACC AAGACCTACATAAGAGATGGCATCAAGAAGCA GCAGATTGATTCCATCATGTTGACCAGGCAG GACCGAGATCCAGTCGGTGTGGAGGAAATG CCTACCGAGATGTTTGAECTCTGATATATACCT CGAATATGTGAGGAGTGGGGAGAAACACAG CTTACATGAGTAATGGGGGACTCGGGAGCCTAA AGGTGTTGTGGCTATCTCCCCACCTGAAATG AAGAAGAGGAGTGGACTTGTGCGACTTCAAG TGCAAAACTTCGCCAACCGTGGTTGGCTTGTCC AGCAAAACTCTGAGGGGCCACCGGAGTGTGAG GTCCACCGAAAATGTTGACAGTGGATAACAGGTC CTTCAAGAGGAGGAGTGGCTATGTCCTTATCA CATAGGTTCTGGCTATGTCCTTGCACCAGGCCAC CAAGCGCCAACGACAGTGAGATATCCAGTGATG CGCTGACGGATGATCCATGTCCATGACCGACA GCAGTGTAGATGGAATTCCCTCCITATCGTGTGG

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GCAGTAAGAACAGCTCCAGAGAGAAATGCAT CGCAGTGTGAAGGCCAATGGCAAGTGTCTCTA CTTCATTTCCGAGAACCCACCGCCTGCCAAG GAGATGACCCCCCTGGAACCCGCCACCTTTCGA GCTGAGCTGATCTCGAGGCTGGAAAAGCTGAA GCTGGAGTTGGAGAGCCGCCACAGCCTGGAGG AGCGCTGCAGCAGATCCGAGAGGATGAAGAG AGAGAGGGCTCCGAGCTCACACTCAATTGGCG GAGGGGGGCCACCGCAGCAACCCCTCTCCCTA CTGCCCTCCGOCAGCTACGAGGAAGACCCGCA GACGATACTGGACGATCACCGTCCAGGGTCT CAAGACCCCTGGCTGCCAGTCTCCAGGGTAGG CCCGTATAGCCCCCGCTCCCGCTCCCCGGACCA CCACCAACCACCACTTCCAGTACCAACTCCCT GCTCCCCCGGGTGCAAGCTGCCCTCCCGCGGC CGCCTCGCCGGGCCCTGCCCTCTCGGGGG CAAAGGCTTGTGACCAAOCAAGACGACGAAGC ATGTCCACCACCACTACATCCACCACCATGCC TCCCCAAGACCAAGGAGGAGATCGAGGGGGAG GCCACGCAAGCGGGTCACTGCTTCTGCCCTGGG GGCAGCGAGTATTACTGCTACTCGAAATGCAA AGCCACTCCAAGGCTCCGAAACCATGCCAG CGAGCAGTTGGCGGCAGCAGAGOCAGTACCTT GCCAAACGCAATGGGAAAOGCACGGAGGCCGG GCCCTGGCCCTGCCGCCAGGGAGGGAGGGGCC CCCCCGGGAGCTGGGCCCTGCAAGCTCCCCGG GAGGAAGGAGACAGGGTGCAGGGATGTCGGCA GTGGATGCTGGAGAGTGAAGGGCAGAGCAAGC CCAAGCCCCATAGTCCCCAAAGCACAAAAAAAG GCTTACCCCTGGAGCTGCCCCGCTGCTGCTCA GGCGAACGAGCCAGCGGGCACCACATGTGGGG GGCAGACAGCGGGCACCCCCCGCACCAACCCCC GTGCCCTGACCCACCCAAACACGCTGGCTCAGC TGGAGGAGGCCCTGTCGCAAGGCTAGCTGAGGTG CGAAGCCCCAAAGCAOCCGGTGTGTGGCC AGTCAGCAGAGGGACAGGAATCATTCGGCCAC TGTTCAGACGGAGCCACACCCCTCTCCAATCC AAGCCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGAGCCAA AGAAACTGGCAGGTGTCCACGCCGCTCCAGGCC AGTGAGTTGGTGTCACTTACCTTCTGTGGGG AAGAAATTCCATACCCGGAGGAATGCTGAAGGCT CAGAGCTTGACCCCTGGGCCACTTAAAGAGCAG CTCAGCAAAAAGGAAATTATAGGTATTACTTC AAAAAAGCAAGCGATGAGTTGCCCTGGAGC

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGTGTGAGGGAGATCTGGGAGGGATGAGACGG TGCTCCCGATGTATGAAGGCCGGATTCTGGGCA AAGTGGAGCGGATCGATTGAGCCCTGGGGCTG GCTTGGTGAACGTGTTGGAGGCCGGAAAGCTCTTG TGAACGTGTCGGCTGTGAGCAACTGCGACAAA ACATTTGAAGGAAAATTAAACCAATGAAGAA GACAAAGTCAAGGAAGAACATCGGCCAGTGGGC CTICGGGAGGGCGGGGGAGGTGATTTCATG ATTCAATGAACCTGGGTACTGACTGAGATAAGAAA AGCCTGAACATATTATTAAAAACATGACCACTC TTGGCTATTGAAGATGCTGCCGTGATTGAGAG ACTGOCATAACATAATATGACTCTAGGGAT CTGAAATCATAAAACTAAGAGAAACTGTGTATA GCTTACCTGAACAGGAATCCTACTGATATTAA TAGAACAGTTGATTCCCCCATCCCCAGTTAT GGATATGCTCTTAAACTTGAAGGGGGAGAC AGGAAGTTTAATTGTTCTGACTAAACCTAGGA GTTGAGCTAGGAGTOCGTTCATGGTTCTCAC TAACAGAGGAATTATGCTTCACTACGTCCT CCAAGTGAAGACAGACACTGTTAGACAGACTTT TTAAAATGGTGCCTTACCAATTGACACATGCAGA AATTGGTGCCTTGTGTTTCTATGCTG CTCTGTTTGTCTAAAGGCTTGAGGGGTTGACC ATGTTGCGTCATCATCAACATTGGGGGTGT GTGGA TGCGATGATCTGTTGCAGAGGGAGAG GCAGGGAAACCTGCTCCTCGGGCCCCAGGTTG ATCCTGTGACTGAGGCTCCCTCATGTAACCT CCCCAGGCCAGGGCCCTGAGGCTGCTAGAAAT CACTGCCGCTGTGCTTCTGTAAGAACAGT CCTGTTTGTGTTCTGTTTGTGTTACATT AGTCATGGACACAGCATTCAAGGAACATACCC CCTGCCCAACAAGAAATGAACAGTTGTAAGG AGACCCAGCAGCACCTTCTCCACACACCTTC ATTGATGTTGGGGTTTGTGTTAAGTTAATC TGTACATTCTGTTTGCCTTACTTGTACTAT ACATCTGTATATAGTGTACGGCAAAAGAGTATT AATCCACTATCTCTAGTGTGTTGACTTAAATCA GTACAGTACCTGTACCTGCACGGTCACCCGCTC CGTGTGTCGCCCTATATTGAGGGCTCAAGCTTT CCCTGTTTGTGAAAGGGGTTATGTATAAATA TATTGATGCTTTTATTACAAGTCTGTTACTC AATGACTTGTGTCATGACATTGTTCTACTTAT ACTGTAATTATGCAATTAAAGAGTTCAATTAA AGGAAAATTACTTGGTACAATAATTATGTAAT TAAGAGATGTAGCCTTATTAAGAAATTATTT TTCAAAAAAAAAAA
87	Secuencia de aminoácidos humana de Axin2	

ES 2 978 963 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MSSAMLVTCLPDPSSSFREDAPRPPVPGEGETPP CQPGVGKGQVTKPMPPVSSNTRRNEDGLGEPEGR ASPDSPLTRWTKSLHSLLGDQDGAYLFRTFLERE KCVDTLDWFACNGFRQMNLKDTKTLRVAKAIY KRYIENNNSIVSKQLKPATKTYIRDGIKKQQIDSIMF DQAQTEIQSVMEENAYQMFLTSIDILEYVRSGGE NTAYMSNGGLGSLKVVCGYLPTLNEEEETCAD FKCKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETVDGYRS FKRSDPVNPYHIGSGYVFAPATSANDSEISSDALT DDSMSMTDSSVDGIPPYRVGSKKQLQREMRHSV KANGQVSLPHFPRTHRLPKEMTPVEPATPAAELIS RLEKLKLELESRHSLERLQQIREDEERESEGSELTLN SREGAPTQHPLSLLPSGSYEEDPQTILDDHLSRVL KTPGCQSPGVGRYSPRSRSRPDHHHHHHSQYHSLL PPGKLPAAASPGACPLLGGKGFTVKQTTKIVH HHYIHHHAVPKTKEEIEAEATQRVHCFCPGGSEY YCYSKCKSHSKAPETMPSEQFOGSRGSTLPKRNG KOTEPGLALPAREGGAPOGAGALQLPREEGDRSQ DVWQWMLESERQSKPKPHSAQSTKKAYPLESAR SSPGERASRIHLWGONSGHPRTTPRAHLETQDPA MPPLTPPNTLAQLEEACRRLAEVSKPPKQRCCVA SQQRDRNHSATVQTGATPFSNPSLAPEDHKEPKK LAGVHALQASELVVTYFFCGEEIPYRRMLKAQSL TLGHFKEQLSKKGNYRYYFKKASDEFACGAVFEE IWEDETVLPMYEGRILGKVERID

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una dosis farmacéuticamente eficaz de dicho inhibidor de la señalización de ActRII,
 5 en donde el sujeto ha sido seleccionado basándose en:
 (a) niveles elevados del factor 2 de transcripción relacionado con runt (Runx2) en comparación con los niveles de Runx2 en una población de referencia;
 (b) niveles elevados del homólogo 1 de Snail (Snai1) en comparación con los niveles de Snai1 en una población de
 10 referencia;
 (c) niveles elevados de fosfoSmad2 en comparación con los niveles de fosfoSmad2 en una población de referencia;
 (d) niveles elevados de colágeno de tipo 1 alfa 1 (col1a1) en comparación con los niveles de col1a1 en una población de referencia;
 15 (e) niveles elevados de telopéptido de colágeno de tipo 1 carboxiterminal (CTX) en comparación con los niveles de CTX en una población de referencia;
 (f) niveles elevados de Osterix en comparación con los niveles de Osterix en una población de referencia;
 (g) niveles reducidos de actina alfa de músculo liso (alfa-SMA) en comparación con los niveles de alfa-SMA en una población de referencia;
 20 (h) niveles reducidos de miocardina (MYOCD) en comparación con los niveles de MYOCD en una población de referencia;
 (i) niveles reducidos de proteína inhibidora del eje 2 (Axin2) en comparación con los niveles de Axin2 en una población de referencia;
 25 (j) niveles reducidos de proteína 22-alfa de músculo liso (Sm22-alfa) en comparación con los niveles de Sm22-alfa en una población de referencia;
 (k) niveles elevados de fosfoSmad3 en comparación con los niveles de fosfoSmad3 en una población de referencia; y/o
 30 (l) niveles elevados de proteínas urinarias en comparación con los niveles de proteína urinaria en una población de referencia,
 en donde la población de referencia:
 (i) consiste en personas sanas;
 (ii) consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que el sujeto;
 35 (iii) consiste en personas sin enfermedad cardiovascular;
 (iv) consiste en personas sin calcificación vascular;
 (v) consiste en personas sin enfermedad renal;
 (vi) consiste en personas sin enfermedad renal crónica;
 (vii) consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial; o
 40 (viii) consiste en personas sin hipertrofia ventricular izquierda, y
 en donde la enfermedad es:
 (a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica en estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica con enfermedad mineral y ósea;
 (b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;
 45 (c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;
 (d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o
 (e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.
2. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 1, en donde la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es:
 50 (a) aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, o aproximadamente 1 g o aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg;
 (b) se administra mediante inyección; y/o
 (c) se administra:
 55 (i) una vez cada 14 días;
 (ii) una vez cada 21 días;
 (iii) una vez cada 28 días;
 (iv) una vez cada 42 días; o
 (v) de forma continua y/o indefinida.
- 60 3. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde los niveles elevados de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix son:
 (a) aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, respectivamente, en la población de referencia; o

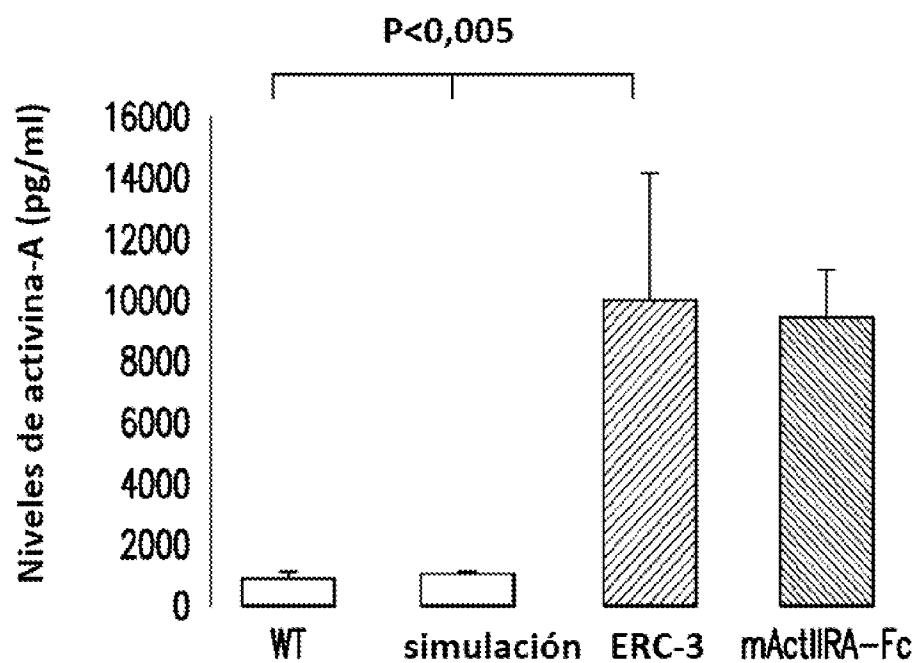
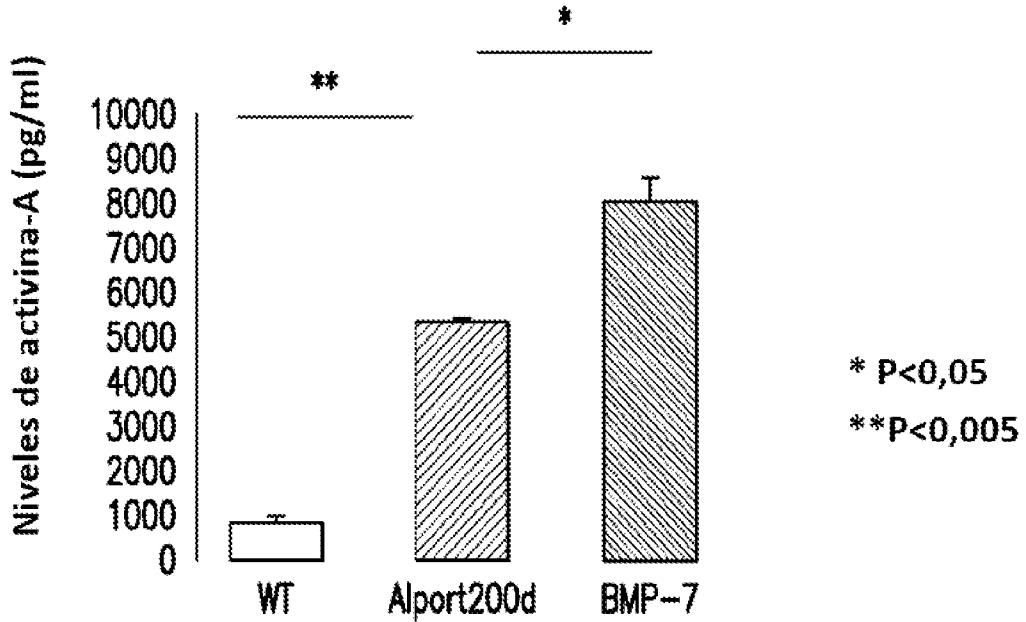
- (b) iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior en la población de referencia
- 5 4. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde los niveles disminución de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son:
- (a) aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en la población de referencia; o
- 10 (b) iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior en la población de referencia.
- 15 5. Un inhibidor de la señalización del receptor de activina de tipo II (ActRII) para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende:
- (a) administrar al sujeto una dosis inicial de un inhibidor de la señalización de ActRII;
- (b) tomar una primera medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto;
- 20 (c) después de un periodo de tiempo, tomar una segunda medición del nivel de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el sujeto; y
- (d) administrar al sujeto una dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII, y en donde la dosis ajustada se basa en el cambio detectado entre la primera medición y la segunda medición, tratando y/o previniendo así dicha enfermedad, y en donde dicha enfermedad es:
- (a) enfermedad cardiovascular secundaria a enfermedad renal crónica, opcionalmente en donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal crónica de estadio 3, 4 o 5 o una enfermedad renal crónica mineral y ósea; o
- 25 (b) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de calcificación vascular;
- (c) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de rigidez arterial;
- (d) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de hipertrofia ventricular izquierda; o
- (e) enfermedad cardiovascular asociada a y/o resultante de enfermedad renal.
- 30 6. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 5, en donde la dosis inicial del inhibidor de la señalización de ActRII es:
- (a) aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, o aproximadamente 1 g o aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,13 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,26 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg o aproximadamente 1,5 mg/kg;
- 35 (b) se administra mediante inyección; y/o
- (c) se administra:
- 40 (i) una vez cada 14 días;
- (ii) una vez cada 21 días,
- (iii) una vez cada 28 días; o
- (iv) una vez cada 42 días.
- 45 7. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 5 o 6, en donde la dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII es mayor que la dosis inicial si:
- (a) el nivel de Runx2 es elevado en comparación con el nivel de Runx2 en una población de referencia;
- (b) el nivel de Snai1 es elevado en comparación con el nivel de Snai1 en una población de referencia;
- 50 (c) el nivel de fosfoSmad2 es elevado en comparación con el nivel de fosfoSmad2 en una población de referencia;
- (d) el nivel de col1a1 es elevado en comparación con el nivel de col1a1 en una población de referencia;
- (e) el nivel de CTX es elevado en comparación con el nivel de CTX en una población de referencia;
- (f) el nivel de Osterix es elevado en comparación con el nivel de Osterix en una población de referencia;
- (g) el nivel de alfa-SMA es disminución en comparación con el nivel de alfa-SMA en una población de referencia;
- (h) el nivel de MYOCD es reducido en comparación con el nivel de MYOCD en una población de referencia;
- 55 (i) el nivel de Sm22-alfa es reducido en comparación con el nivel de Sm22-alfa en una población de referencia;
- (j) el nivel de fosfoSmad3 es elevado en comparación con el nivel de fosfoSmad3 en una población de referencia;
- (k) el nivel de proteína urinaria es elevado en comparación con el nivel de proteína urinaria en una población de referencia; y/o
- (l) el nivel de Axin2 es reducido comparación con el nivel de Axin2 en una población de referencia, y en donde la población de referencia:
- 60 (i) consiste en personas sanas;
- (ii) consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que el sujeto;
- (iii) consiste en personas sin enfermedad cardiovascular;
- (iv) consiste en personas sin calcificación vascular;
- (v) consiste en personas sin enfermedad renal;
- (vi) consiste en personas sin enfermedad renal crónica;

- (vii) consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial; o
 (viii) consiste en personas sin hipertrofia ventricular izquierda.
8. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 7, en donde la dosis ajustada es:
- 5 (a) aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 35 mg superior a la dosis inicial, o aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg superior a la dosis;
- 10 (b) se administra más frecuentemente que la dosis inicial; y/o
 (c) se administra cada 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35 o 40 días.
9. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 5 o 6, en donde la dosis ajustada del inhibidor de la señalización de ActRII es menor que la dosis inicial si:
- 15 (a) el nivel de Runx2 es reducido en comparación con el nivel de Runx2 en una población de referencia;
 (b) el nivel de Snai1 es reducido en comparación con el nivel de Snai1 en una población de referencia;
 (c) el nivel de fosfoSmad2 es reducido en comparación con el nivel de fosfoSmad2 en una población de referencia;
 (d) el nivel de col1a1 es reducido en comparación con el nivel de col1a1 en una población de referencia;
 (e) el nivel de CTX es reducido en comparación con el nivel de CTX en una población de referencia;
 (f) el nivel de Osterix es reducido en comparación con el nivel de Osterix en una población de referencia;
 20 (g) el nivel de alfa-SMA es elevado en comparación con el nivel de alfa-SMA en una población de referencia;
 (h) el nivel de MYOCD es elevado en comparación con el nivel de MYOCD en una población de referencia;
 (i) el nivel de Sm22-alfa es elevado en comparación con el nivel de Sm22-alfa en una población de referencia;
 (j) el nivel de fosfoSmad3 es reducido en comparación con el nivel de fosfoSmad3 en una población de referencia;
 25 (k) el nivel de proteína urinaria es reducido en comparación con el nivel de proteína urinaria en una población de referencia;
 y/o
 (l) el nivel de Axin2 es elevado en comparación con el nivel de Axin2 en una población de referencia, y en donde la población de referencia:
 (i) consiste en personas sanas;
 (ii) consiste en personas de la misma edad, peso y/o sexo que el sujeto;
 30 (iii) consiste en personas sin enfermedad cardiovascular;
 (iv) consiste en personas sin calcificación vascular;
 (v) consiste en personas sin enfermedad renal;
 (vi) consiste en personas sin enfermedad renal crónica;
 (vii) consiste en personas sin niveles patológicamente elevados de rigidez arterial; o
 35 (viii) consiste en personas sin hipertrofia ventricular izquierda.
10. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 9, en donde la dosis ajustada es:
- 40 (a) aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 35 mg inferior a la dosis inicial, o aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg inferior a la dosis;
- 45 (b) se administra menos frecuentemente que la dosis inicial;
 (c) se administra cada 30, 35, 40, 42, 50, 60, 70, 80 o 90 días; y/o
 (d) se administra de forma continua y/o indefinida.
11. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en donde:
- 50 (a) la primera medición se toma antes del inicio del tratamiento;
 (b) la primera medición se toma inmediatamente después del inicio del tratamiento o en un plazo máximo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o 2 meses del mismo; o
 (c) la segunda medición se toma inmediatamente después del inicio del tratamiento o en un plazo máximo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses del mismo.
12. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 7, en donde:
- 55 (a) los niveles elevados de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, respectivamente, en la población de referencia;
- 60 (b) los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente, en una población de referencia;
- 65 (c) los niveles elevados de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior en la población de referencia; y/o

- (d) los niveles reducidos de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa en el 10% inferior, 5% inferior, 4% inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior en la población de referencia.
- 5 13. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 9, en donde
 (a) los niveles elevados de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%,
 10 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-
 alfa, respectivamente, en la población de referencia;
 (b) los niveles reducidos de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix son
 15 aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% menores que los niveles de
 Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix, respectivamente, en una población
 20 de referencia;
 (c) los niveles elevados de alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa son iguales o aproximadamente 10%, 20%, 25%,
 15 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, o 500% mayores que los niveles de alfa-SMA, MYOCD, Axin2
 y/o Sm22-alfa en el 10% superior, 5% superior, 4% superior, 3% superior, 2% superior o 1% superior en la población de
 referencia; y/o
 (d) los niveles reducidos de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix son iguales
 20 o aproximadamente 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 100% menores que los niveles de
 Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX y/u Osterix en el 10% inferior, 5% inferior, 4%
 inferior, 3% inferior, 2% inferior o 1% inferior en la población de referencia.
14. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en donde el nivel
 de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-
 25 alfa es el nivel de proteína de Snai1, fosfoSmad2, fosfoSmad3, proteína urinaria, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA,
 MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente,
 preferiblemente en donde el nivel de proteína se determina mediante un enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).
 más preferiblemente en donde el ELISA se realiza con
 (a) anticuerpo específico de Runx2 SC-390715 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Runx2;
 (b) anticuerpo específico de Snail sc-393172 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Snai1;
 30 (c) anticuerpo específico de fosfoSmad2 sc-101801 (Santa Cruz) para determinar los niveles de fosfoSmad2;
 (d) anticuerpo específico de fosfoSmad3 sc-130218 (Santa Cruz) para determinar los niveles de fosfoSmad3;
 (e) anticuerpo específico de col1a1 sc-8784 (Santa Cruz) para determinar los niveles de col1a1;
 (f) anticuerpo específico de CTX ABIN1173415 (Antibodies Online) para determinar los niveles de CTX;
 35 (g) anticuerpo específico de Osterix SC-22538 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Osterix;
 (h) anticuerpo específico de alfa-SMA SC-53142 (Santa Cruz) para determinar los niveles de alfa-SMA;
 (i) anticuerpo específico de MYOCD SC-21561 (Santa Cruz) para determinar los niveles de MYOCD; y/o
 (j) anticuerpo específico de Sm22-alfa SC-271719 (Santa Cruz) para determinar los niveles de Sm22-alfa.
15. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el nivel
 40 de Snai1, col1a1, Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa es el nivel de ARNm de Snai1, col1a1,
 Runx2, CTX, Osterix, alfa-SMA, MYOCD, Axin2 y/o Sm22-alfa, respectivamente,
 preferiblemente en donde el nivel de ARNm se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con
 transcripción inversa (qRT-PCR),
 más preferiblemente en donde la qRT-PCR se realiza con
 45 (a) cebadores específicos de Runx2 (SEQ ID NO: 48 y 49) para determinar los niveles de Runx2;
 (b) cebadores específicos de col1a1 (SEQ ID NO: 82 y 83) para determinar los niveles de col1a1;
 (c) cebadores específicos de Snai1 (SEQ ID NOS:78 y 79) para determinar los niveles de Snai1;
 (d) cebadores específicos de Osterix (SEQ ID NO: 52 y 53) para determinar los niveles de Osterix; y/o
 (e) cebadores específicos de Sm22-alfa (SEQ ID NO: 56 y 57) para determinar los niveles de Sm22-alfa.
- 50 16. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde:
 (a) los niveles son en un tejido, preferentemente en donde el tejido es la aorta, el suero, la médula ósea, el hígado o el
 bazo;
 (b) el sujeto es humano; y/o
 55 (c) la población de referencia consiste en 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, o 1000 individuos.
17. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el
 60 inhibidor de la señalización de ActRII es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del
 grupo que consiste en:
 (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:2;
 (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:2;
 (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:2;
 (d) SEQ ID NO:2;
 (e) 90% idéntica a SEQ ID NO:3;
 65 (f) 95% idéntica a SEQ ID NO:3;
 (g) 98% idéntica a SEQ ID NO:3;

- (h) SEQ ID NO:3;
- (i) 90% idéntica a SEQ ID NO:7;
- (j) 95% idéntica a SEQ ID NO:7;
- (k) 98% idéntica a SEQ ID NO:7;
- 5 (l) SEQ ID NO:7;
- (m) 90% idéntica a SEQ ID NO: 12;
- (n) 95% idéntica a SEQ ID NO: 12;
- (o) 98% idéntica a SEQ ID NO: 12;
- (p) SEQ ID NO: 12;
- 10 (q) 90% idéntica a SEQ ID NO: 17;
- (r) 95% idéntica a SEQ ID NO: 17;
- (s) 98% idéntica a SEQ ID NO: 17;
- (t) SEQ ID NO: 17;
- (u) 90% idéntica a SEQ ID NO:20;
- 15 (v) 95% idéntica a SEQ ID NO:20;
- (w) 98% idéntica a SEQ ID NO:20;
- (x) SEQ ID NO:20;
- (y) 90% idéntica a SEQ ID NO:21;
- (z) 95% idéntica a SEQ ID NO:21;
- 20 (aa) 98% idéntica a SEQ ID NO:21;
- (bb) SEQ ID NO:21;
- (cc) 90% idéntica a SEQ ID NO:25;
- (dd) 95% idéntica a SEQ ID NO:25;
- (ee) 98% idéntica a SEQ ID NO:25; y
- 25 (ff) SEQ ID NO:25.

18. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el inhibidor de la señalización de ActRII es:
- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, o
 - 30 (b) una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIA y el dominio Fc de IgG1 humana.
19. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el inhibidor de la señalización de ActRII es un polipéptido que comprende un dominio extracelular de un receptor de ActRIIB asociado a una porción Fc de un anticuerpo mediante un conector.
- 35 20. El inhibidor de la señalización de ActRII para el uso de la reivindicación 19, en donde el dominio extracelular de un receptor de ActRIIB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

**FIG. 1A****FIG. 1B**

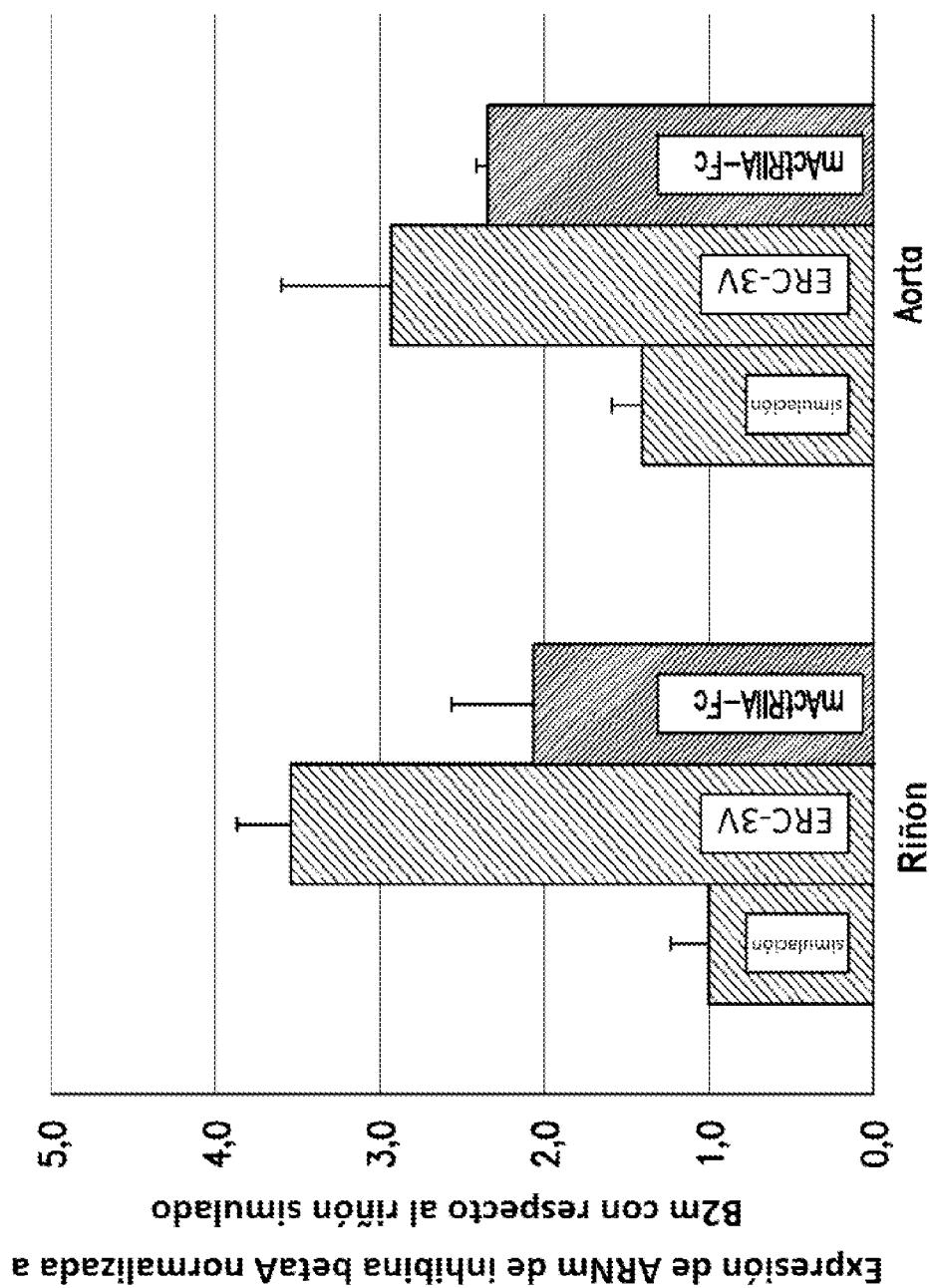
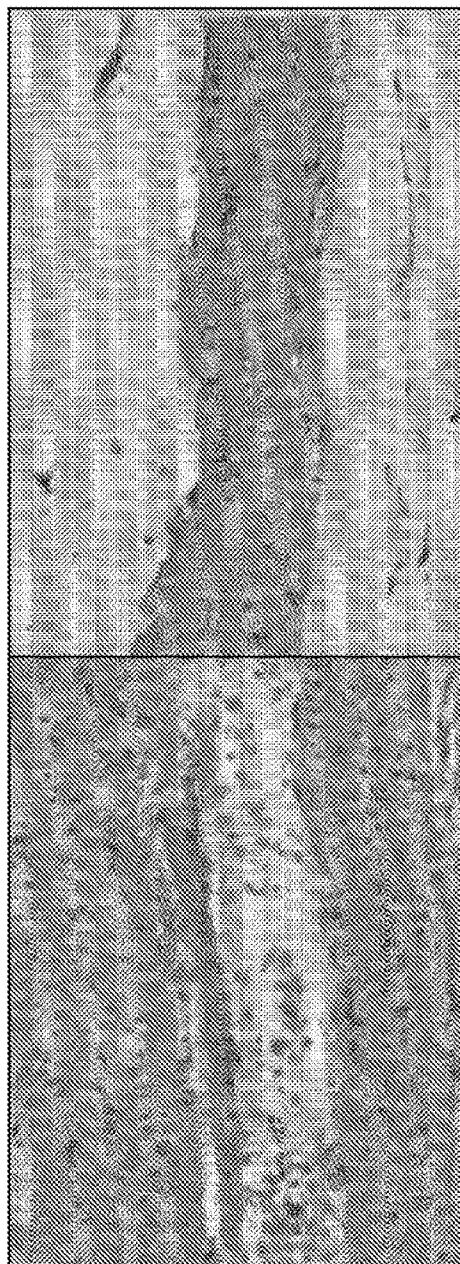
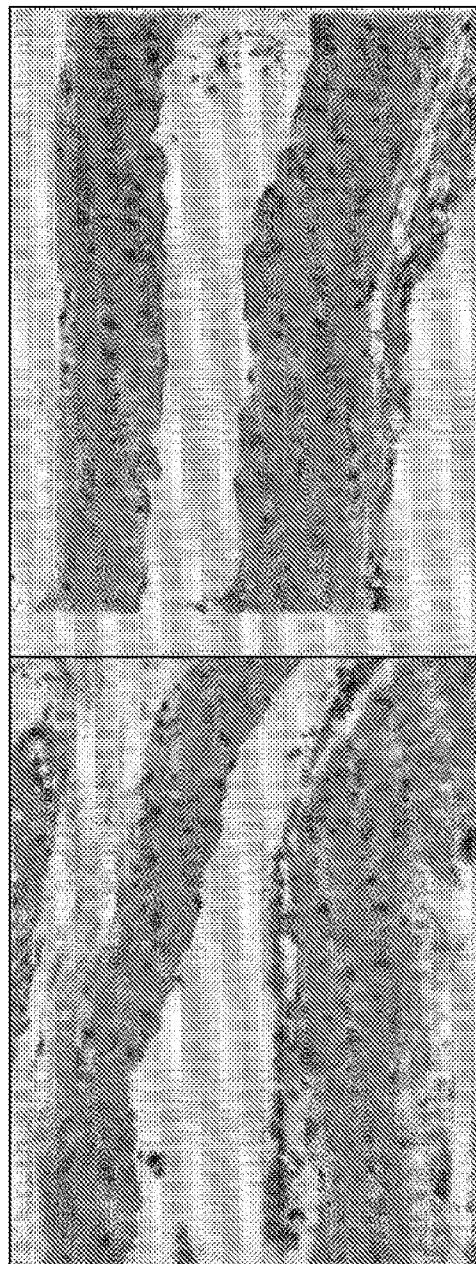


FIG. 3B



Simulación
WT

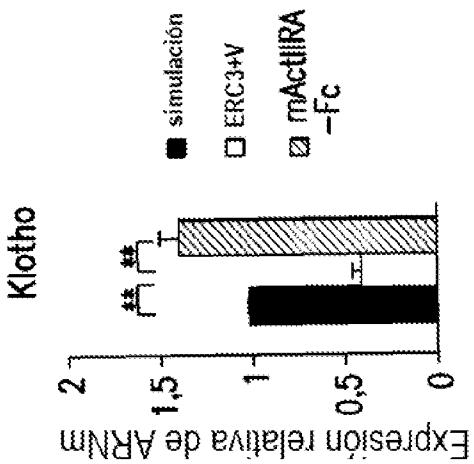
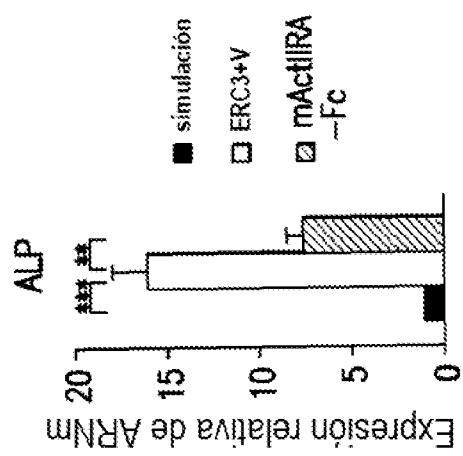
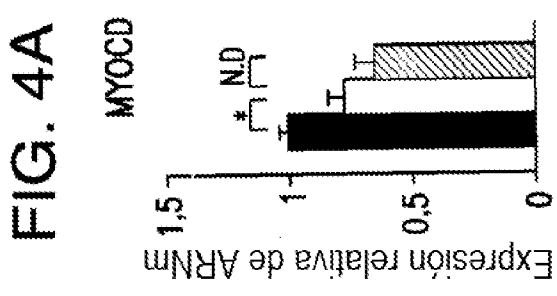
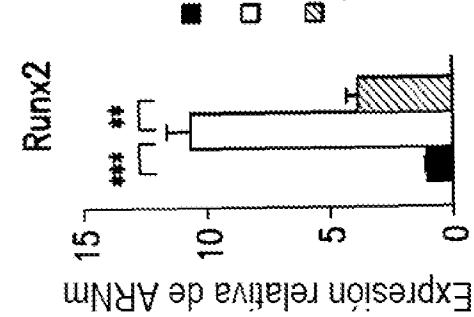
FIG. 3A



mAct||RA-Fc
ERC3 Vehículo

FIG. 3D

FIG. 3C



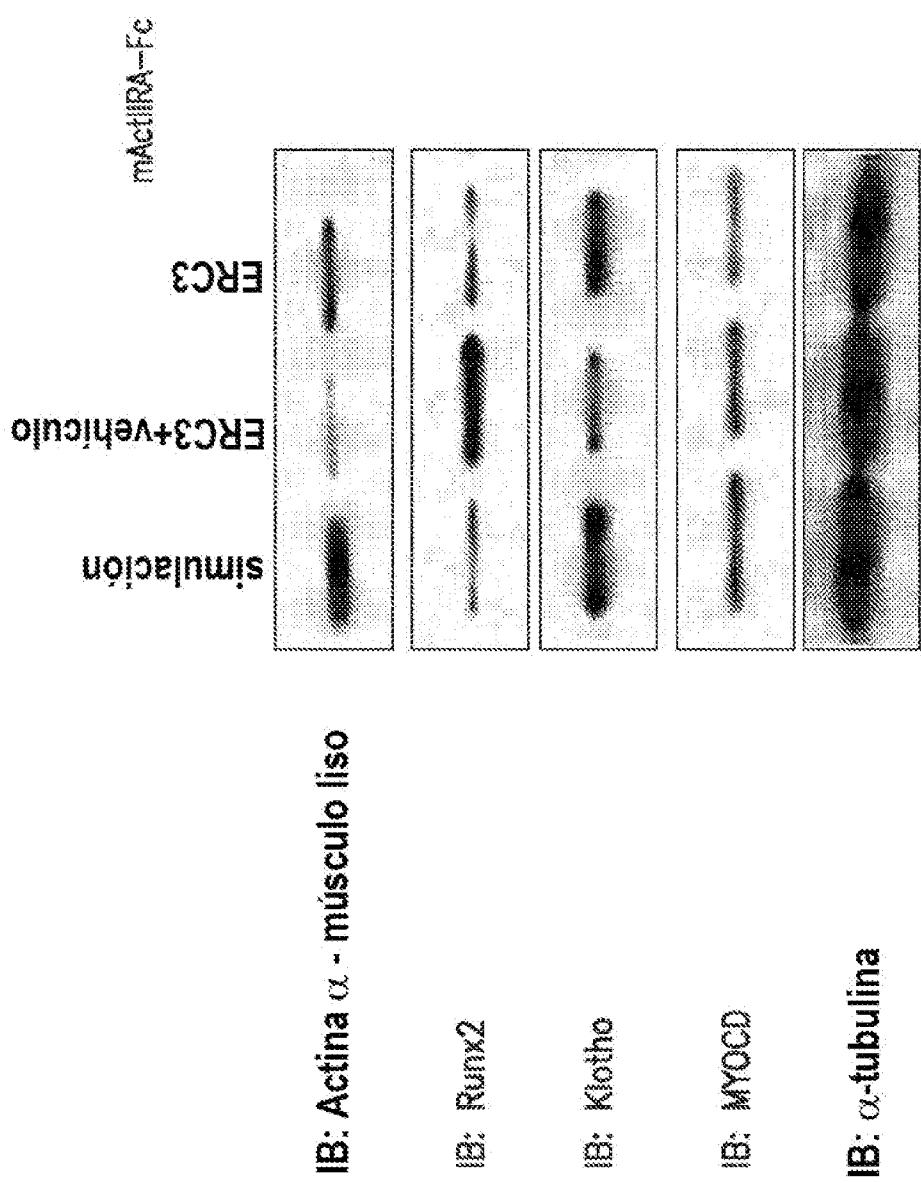
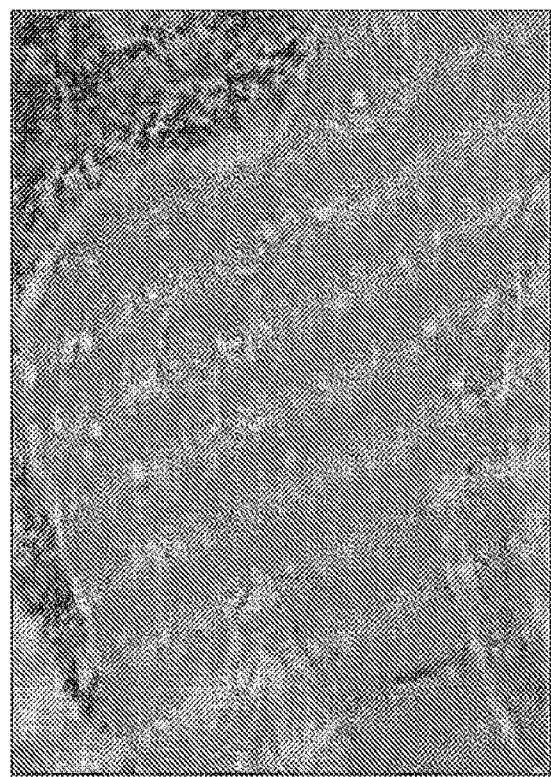


FIG. 4F



ERC-3 Trat. mActII/RA-Fc

FIG. 5A
FIG. 5B



ERC-3 Trat. veh.

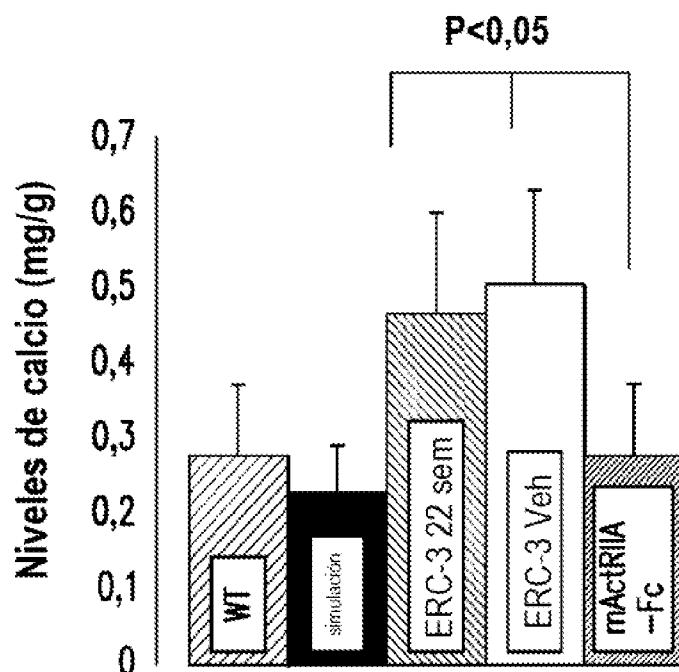


FIG. 6A

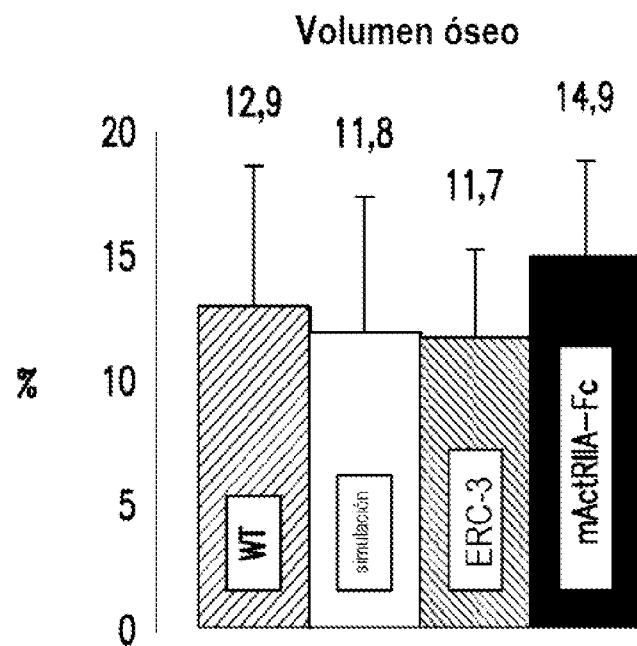


FIG. 6B

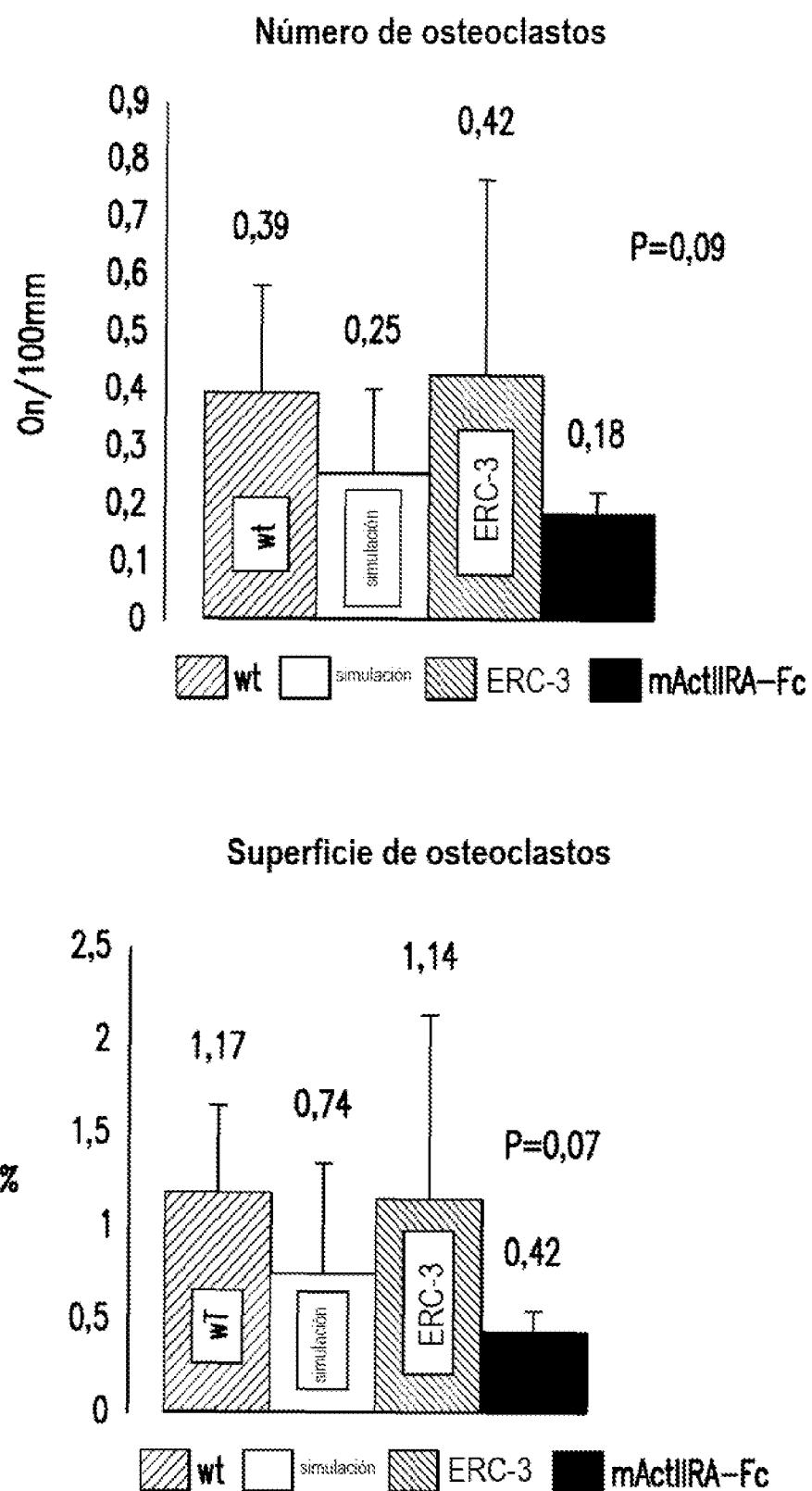
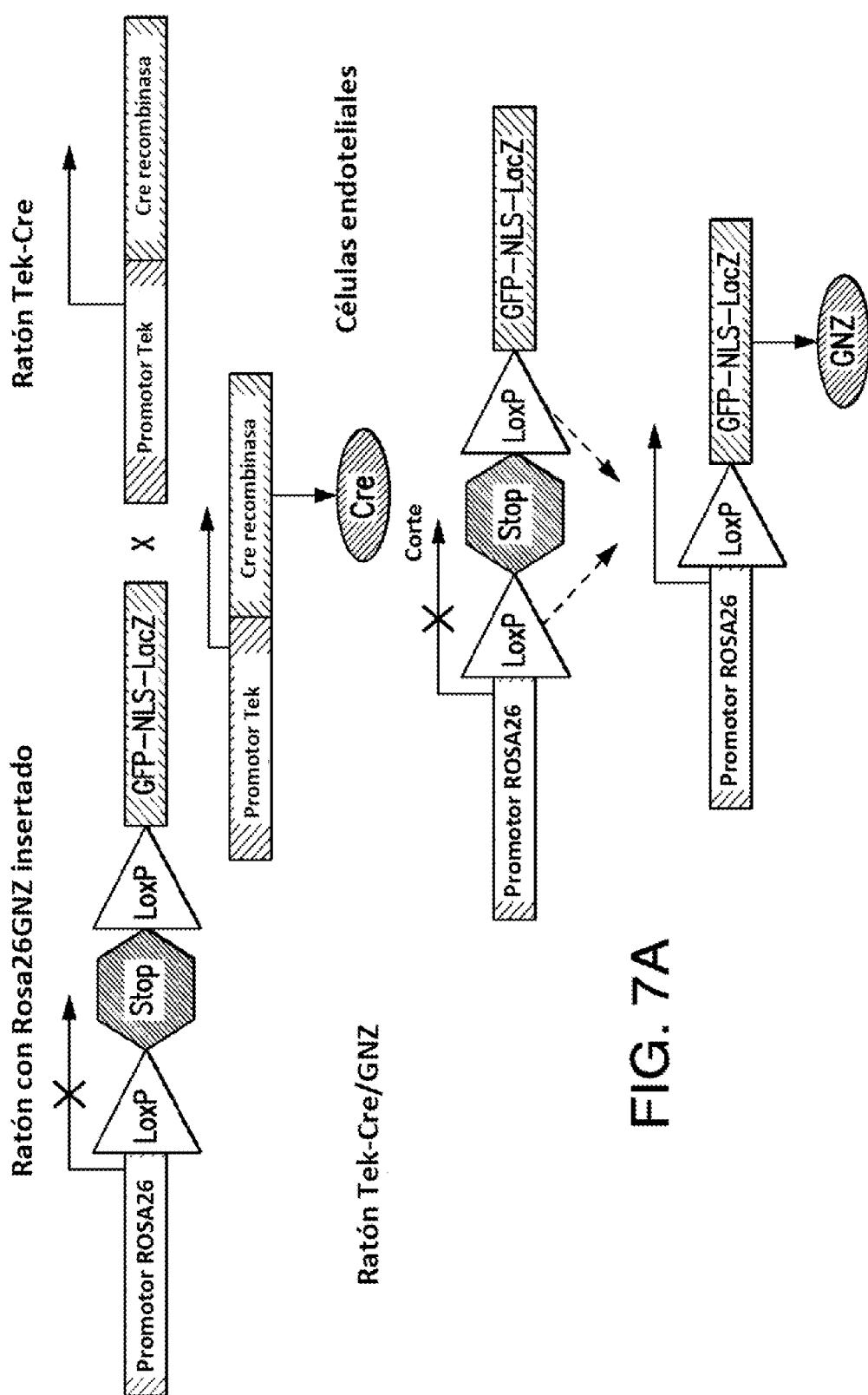


FIG. 6D



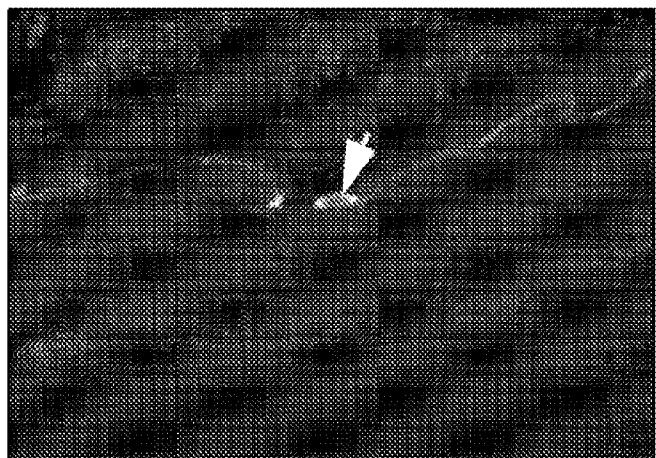


FIG. 7B

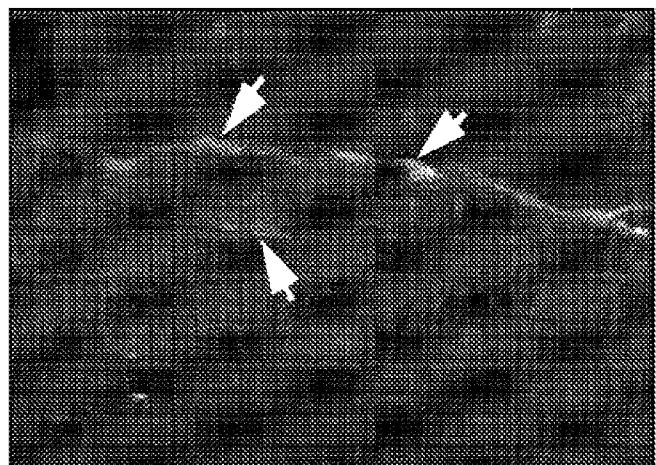


FIG. 7C

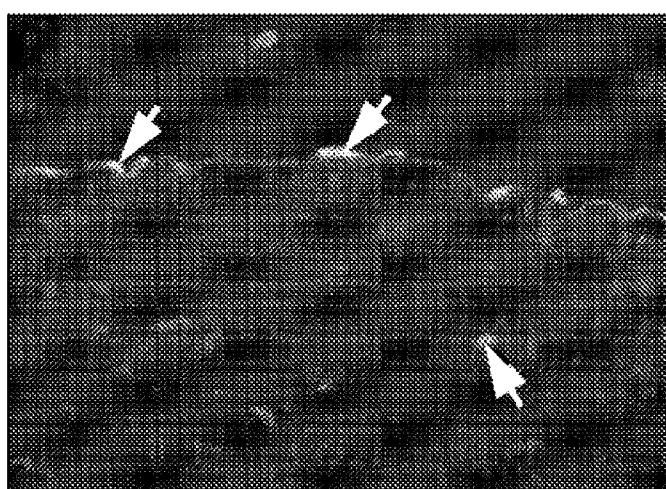
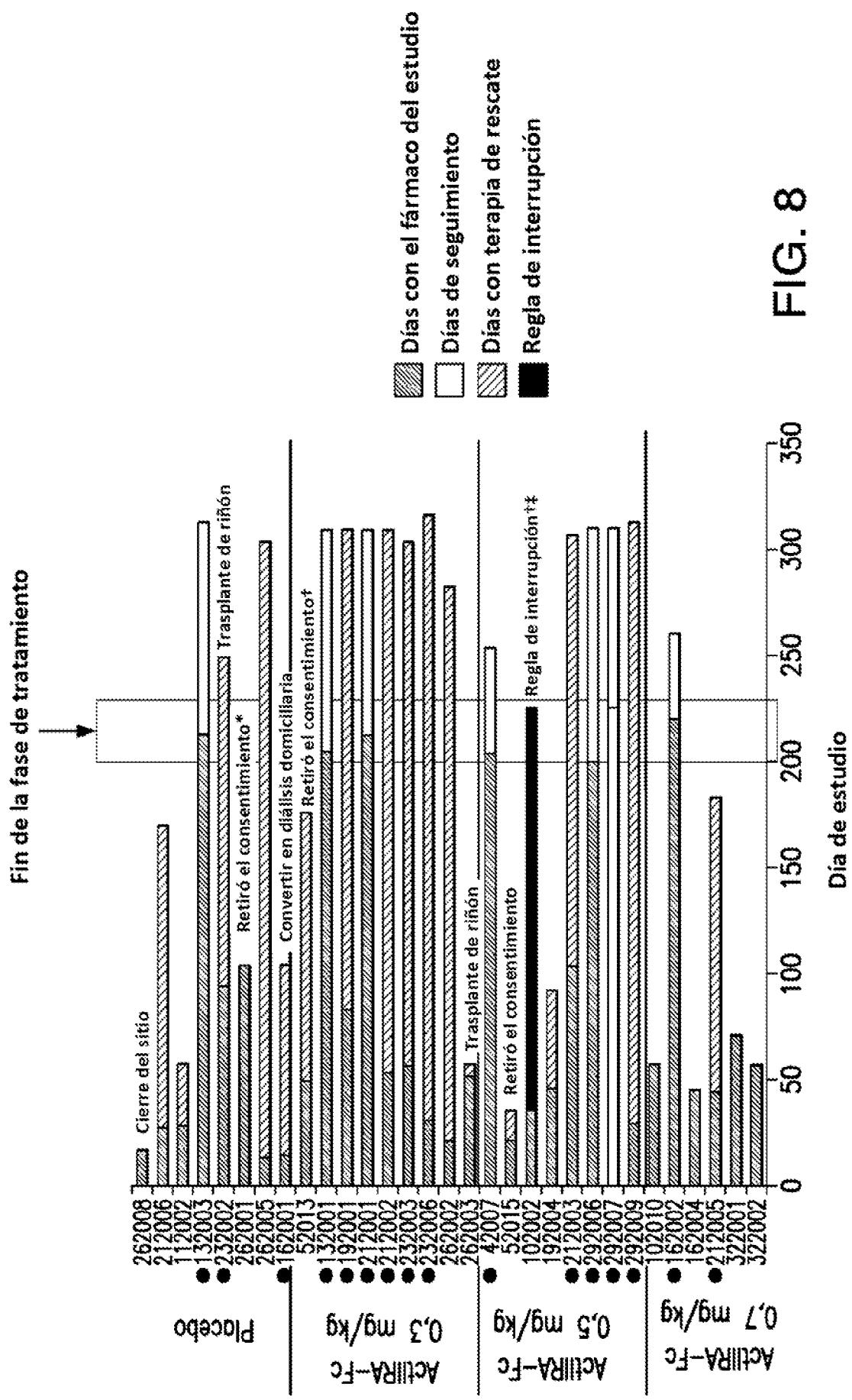


FIG. 7D



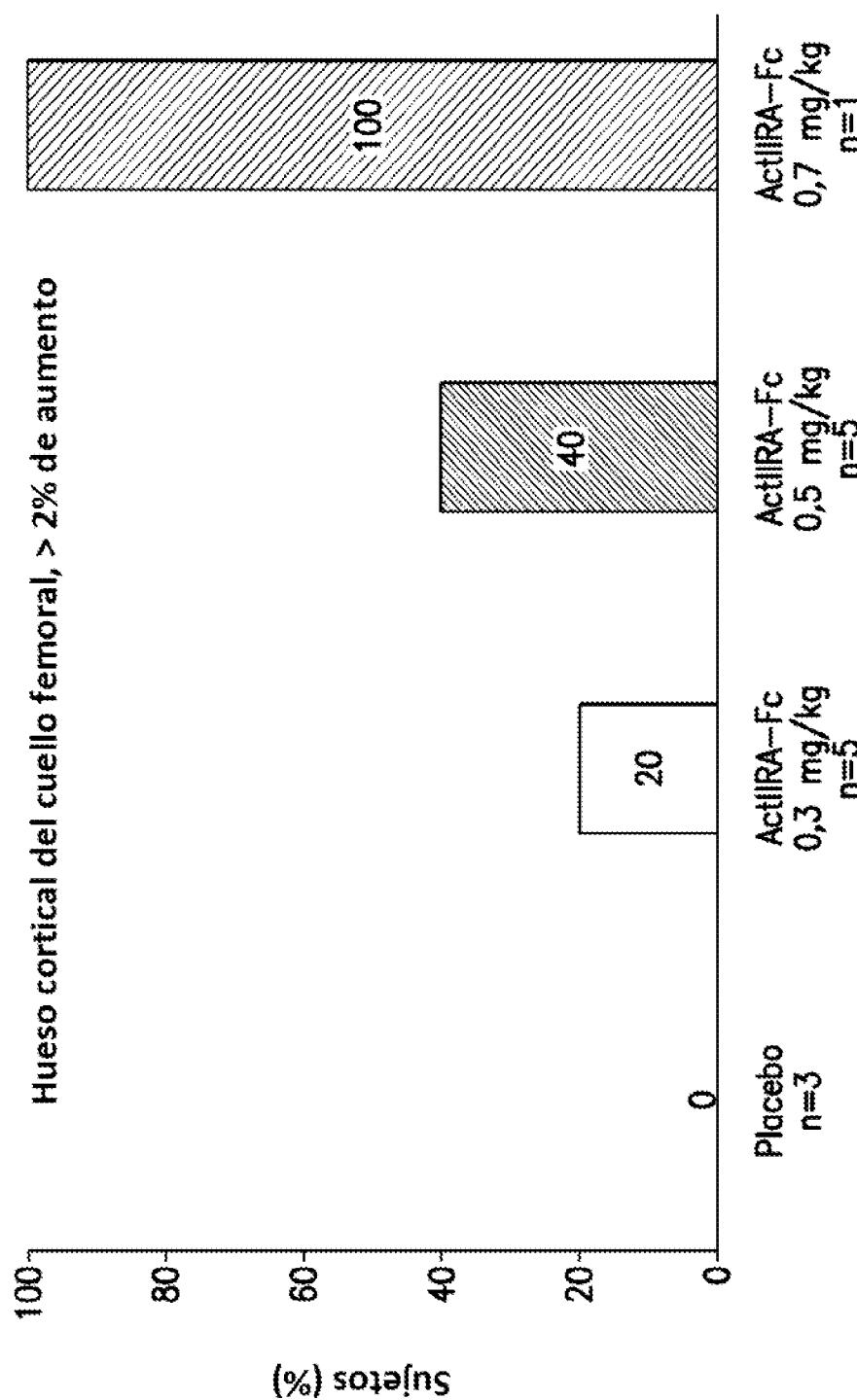


FIG. 9A

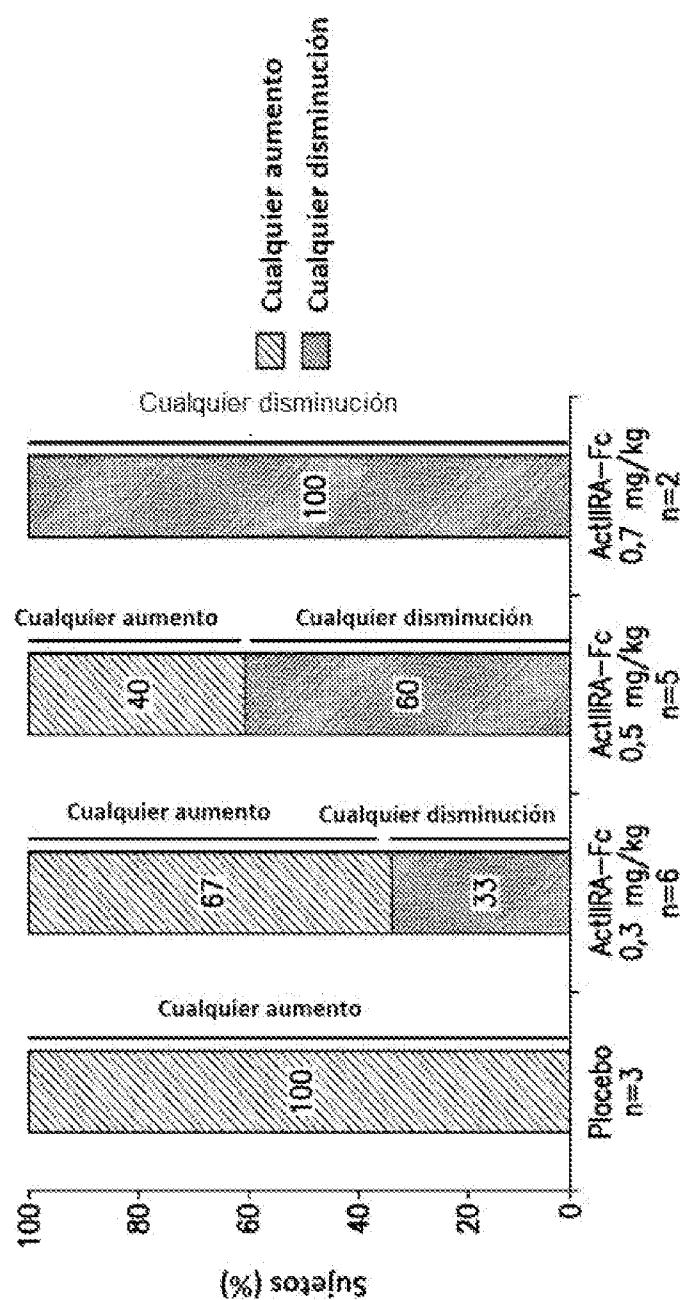
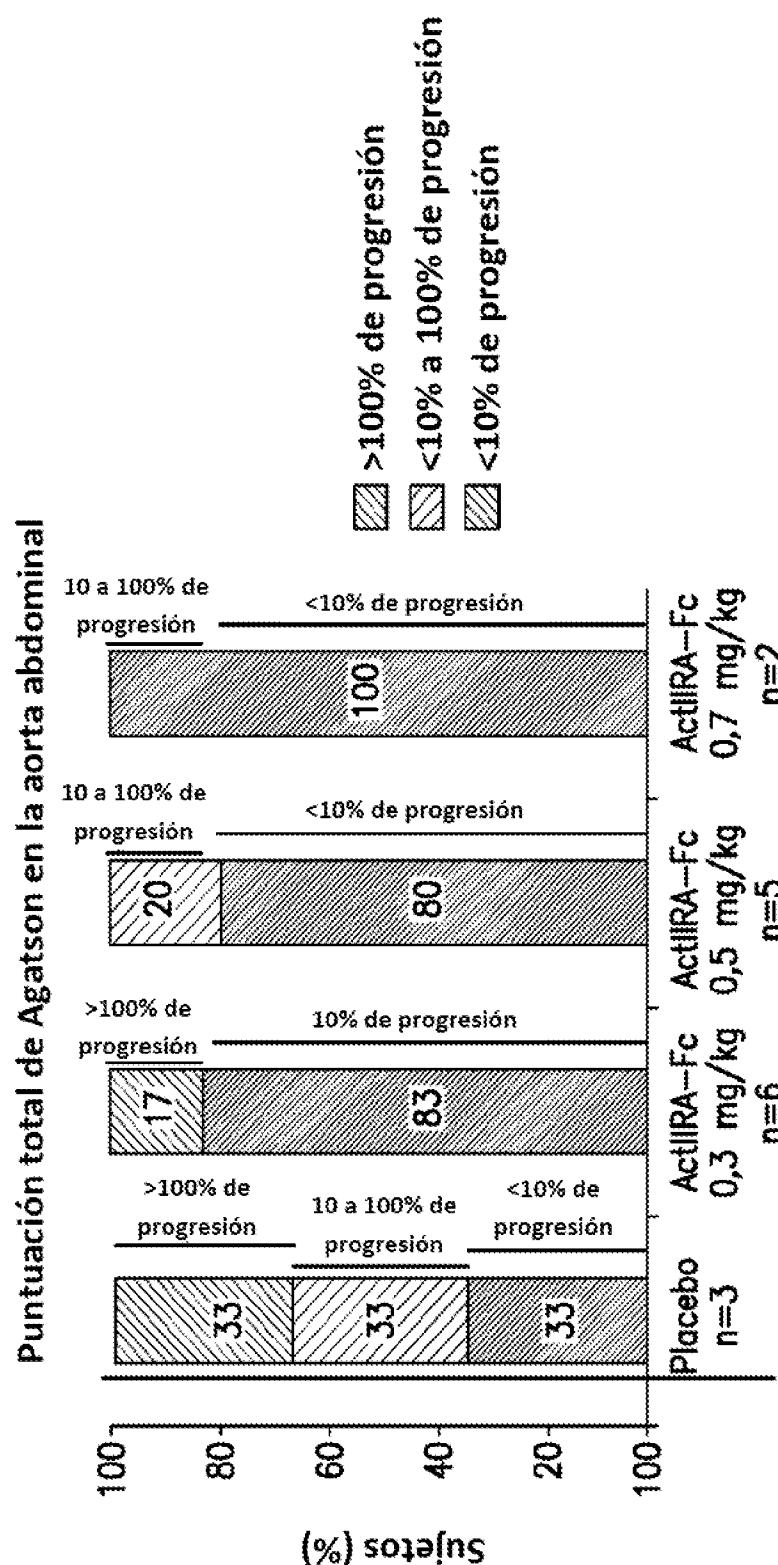


FIG. 9B

**FIG. 10A**

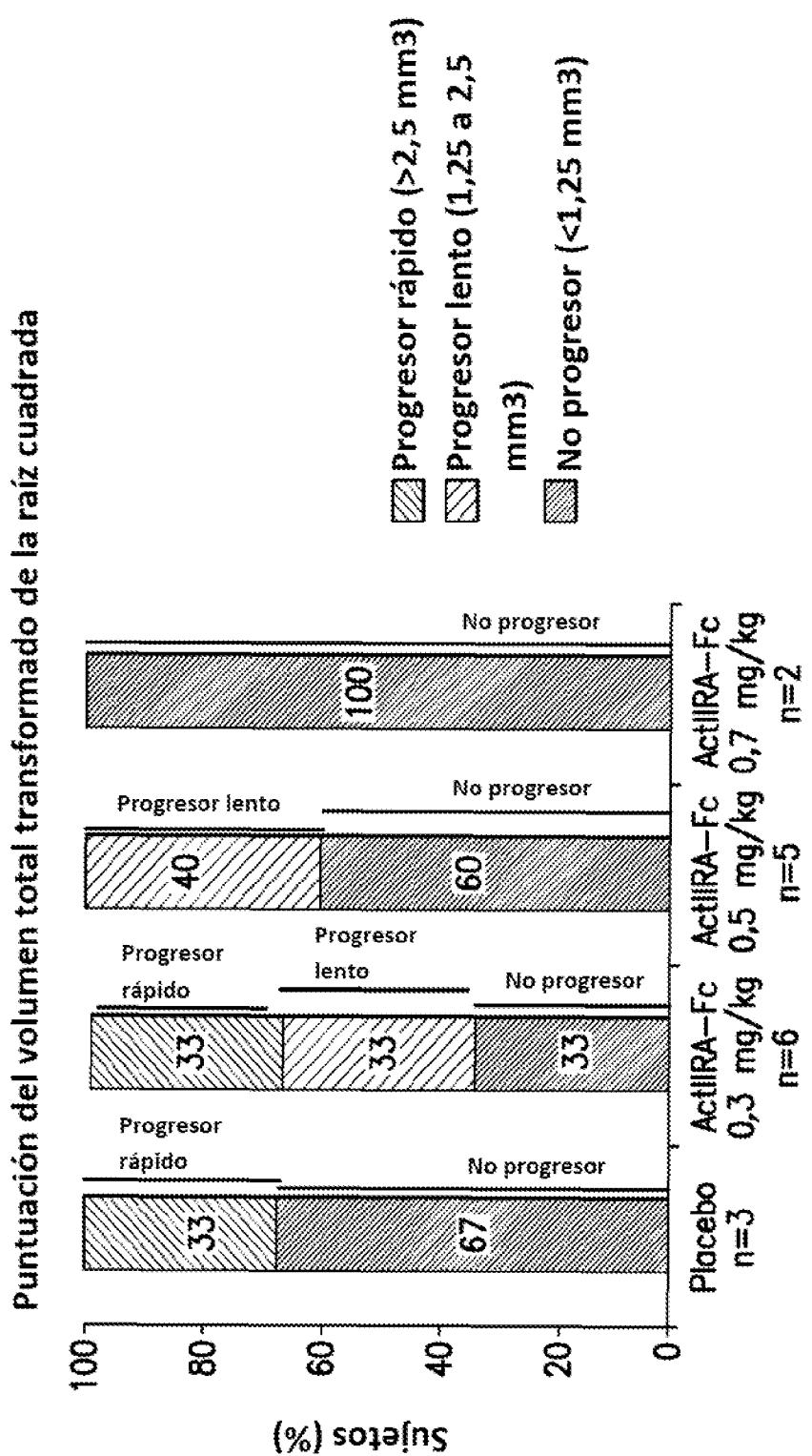
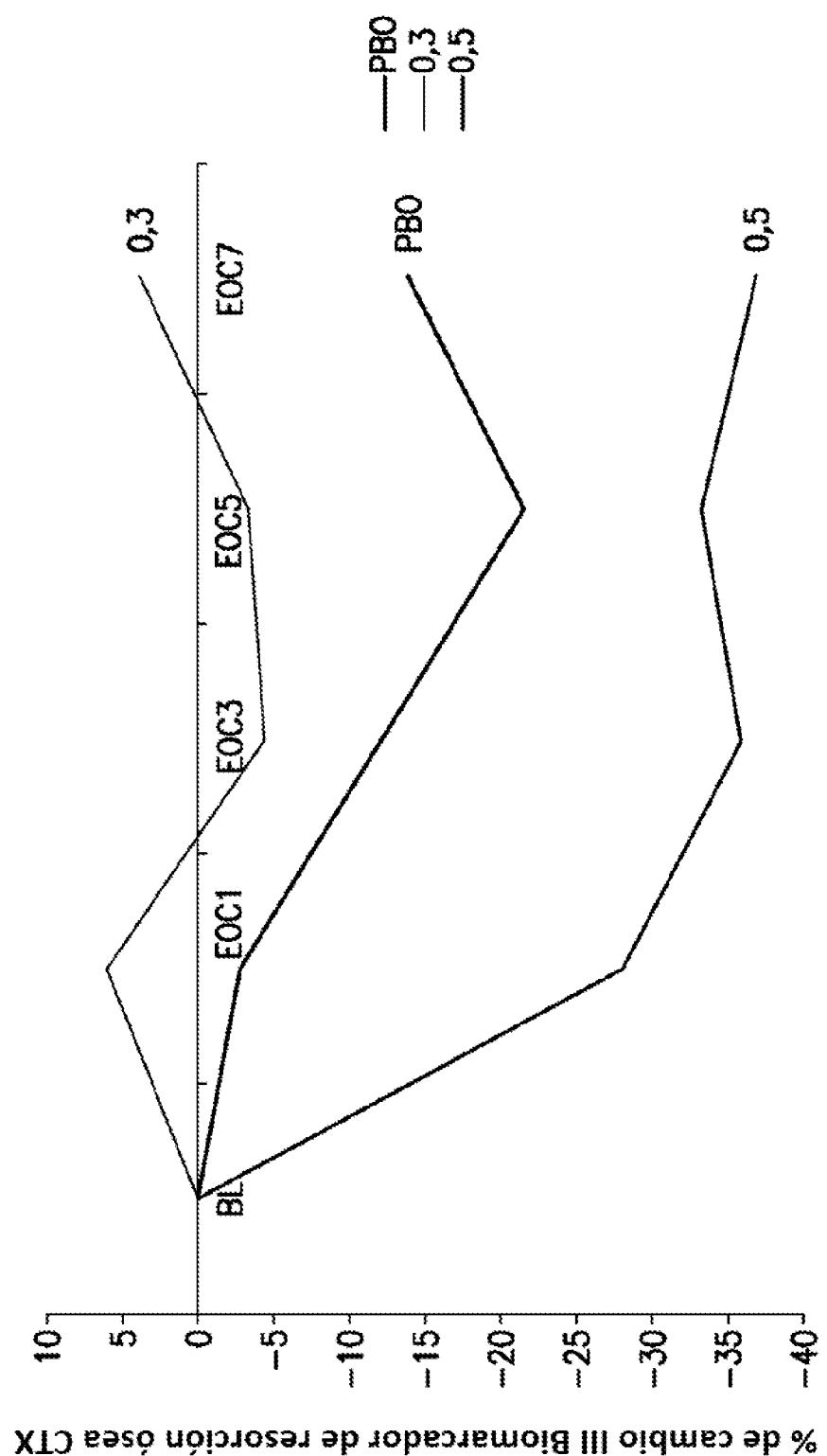
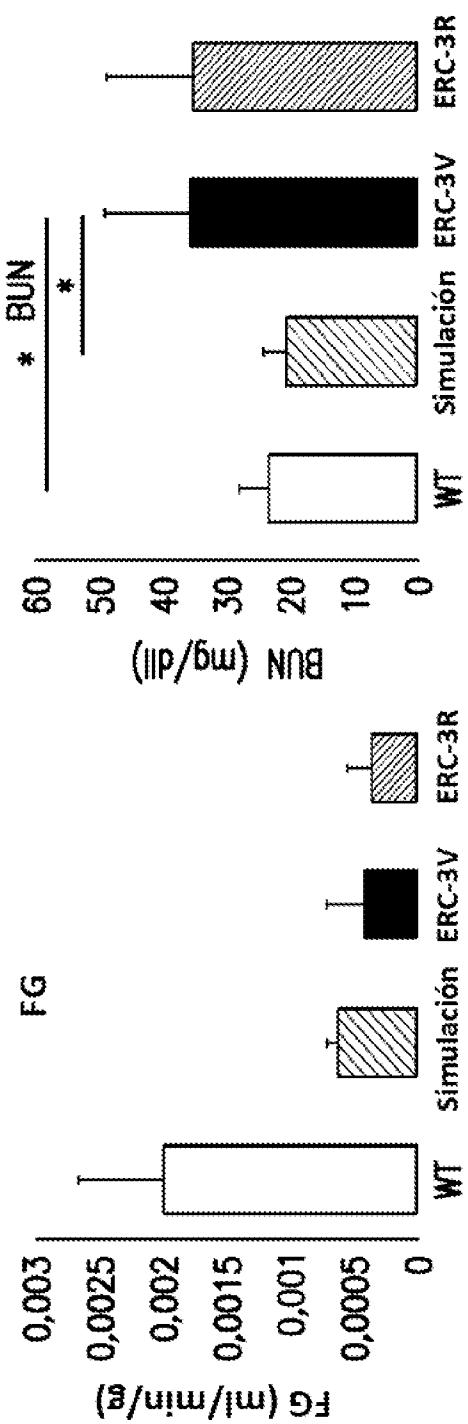


FIG. 10B



EOC=fin del ciclo de dosis.

FIG. 11



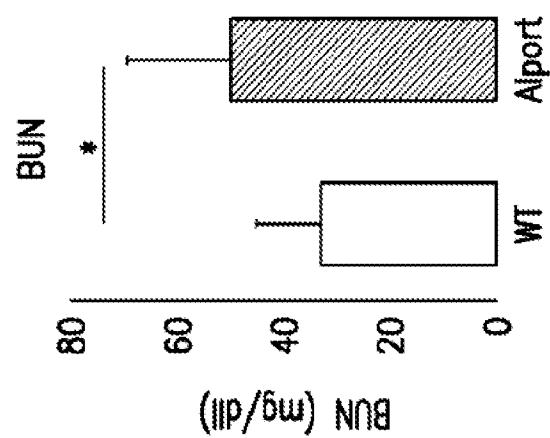


FIG. 12D

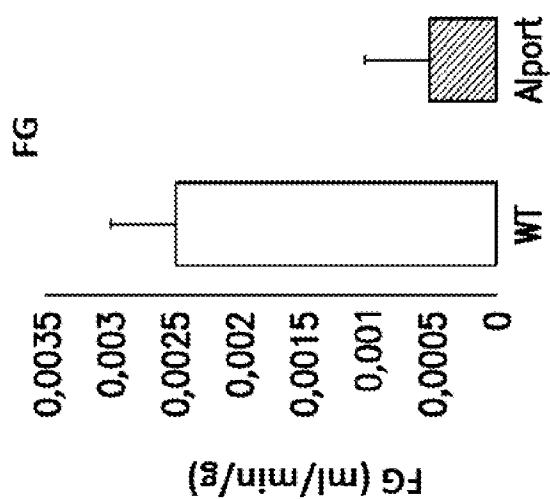


FIG. 12C

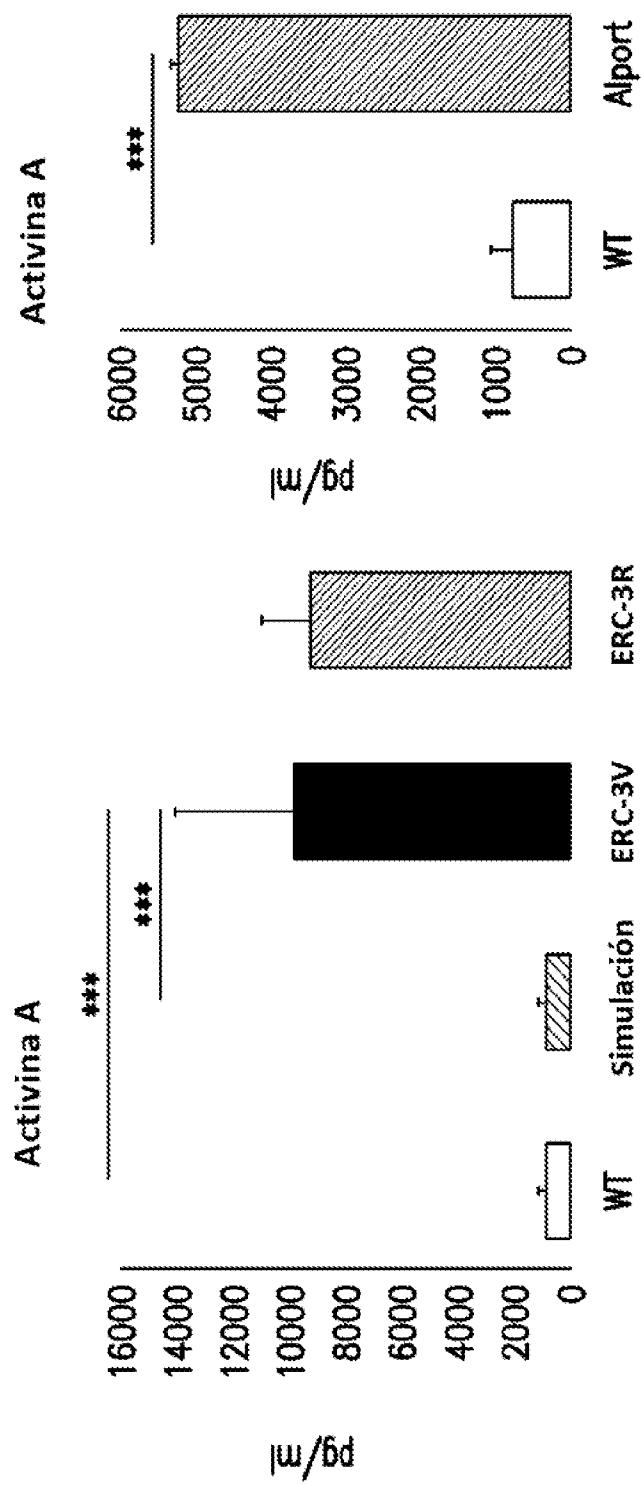
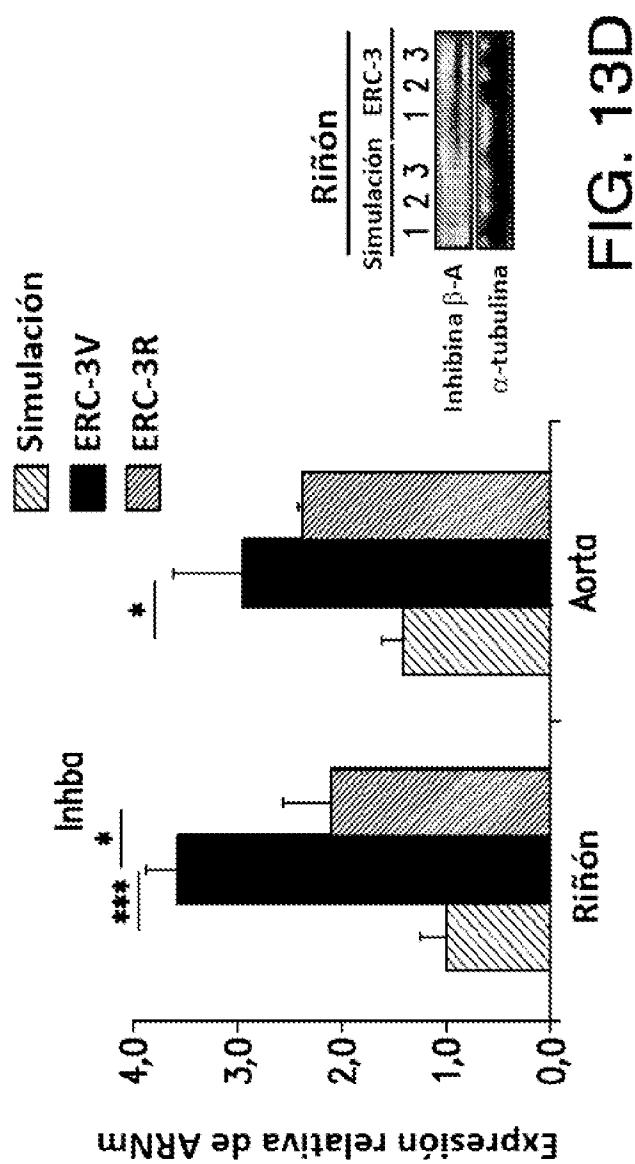
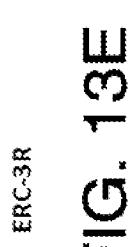


FIG. 13A

FIG. 13B

**FIG. 13D****FIG. 13E**

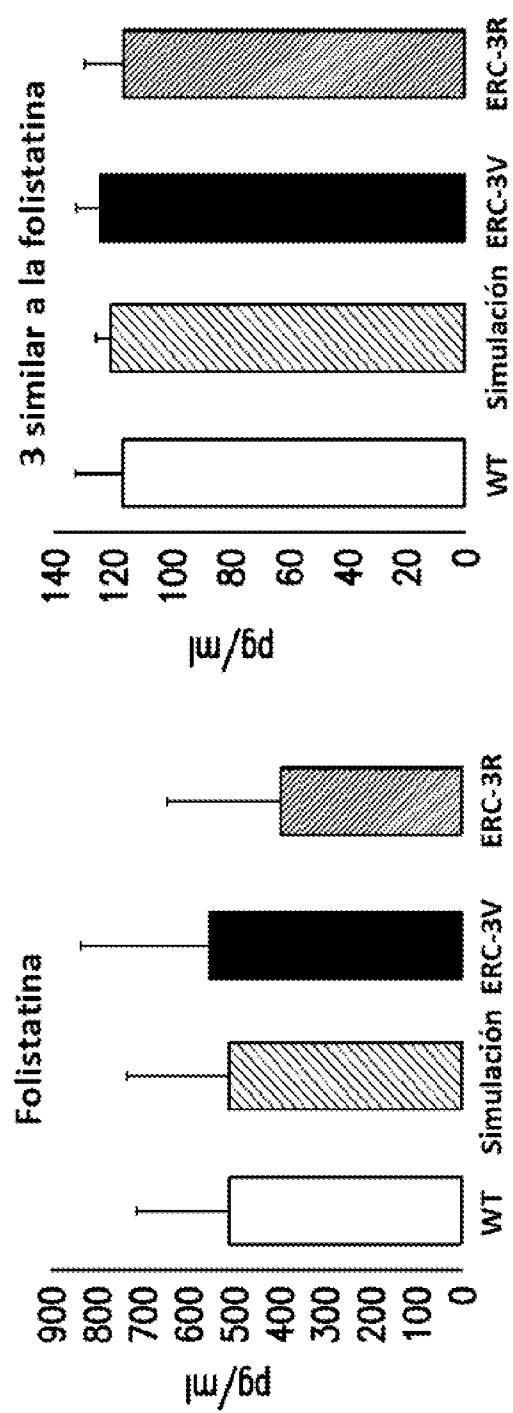


FIG. 13F

FIG. 13G

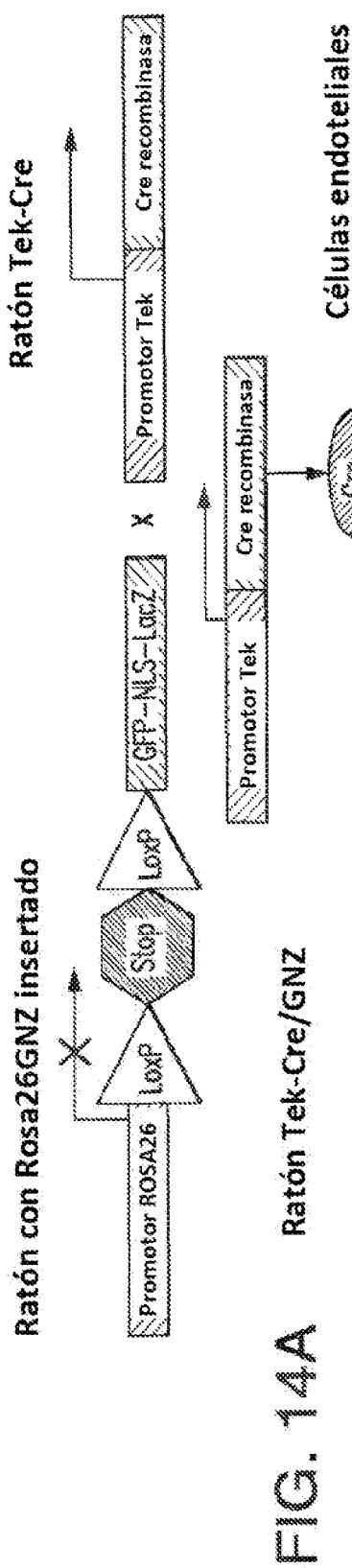


FIG. 14A

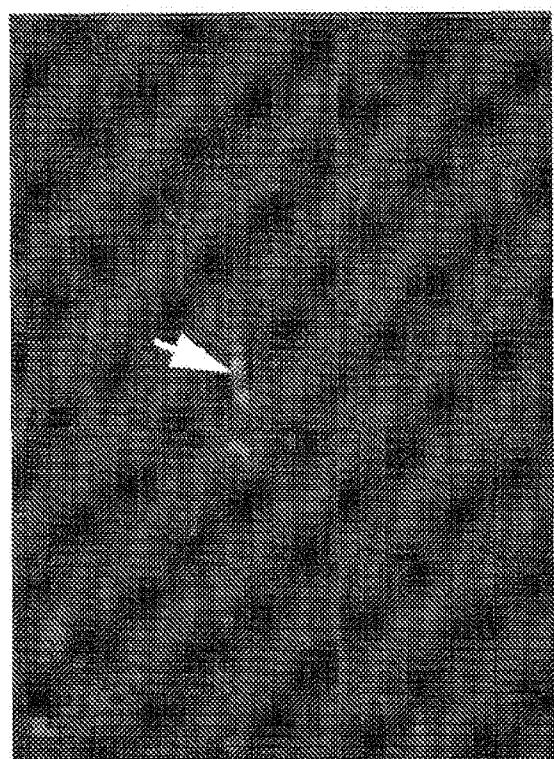


FIG. 14B

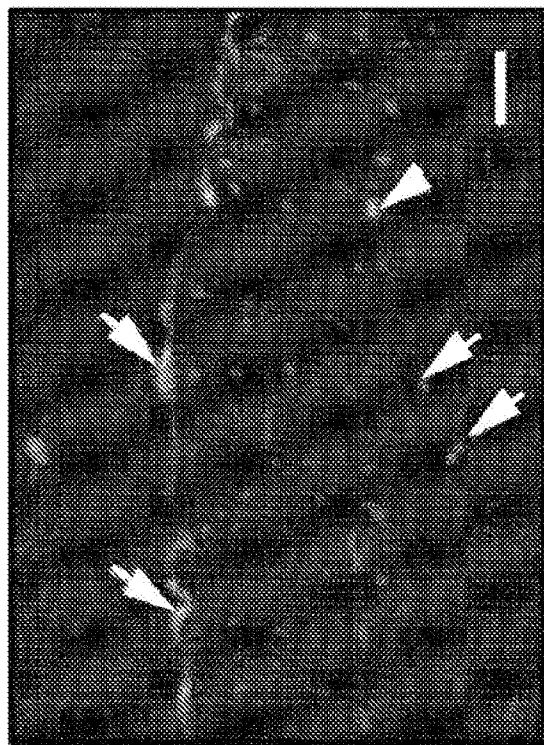
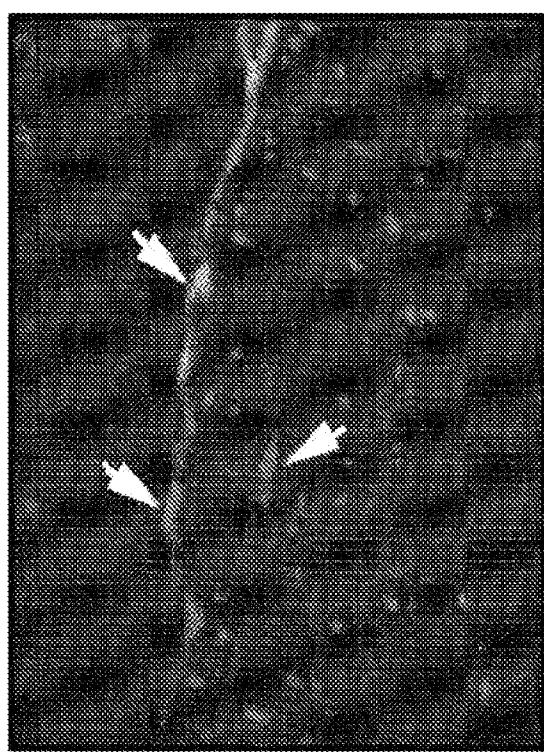


FIG. 14C

FIG. 14D

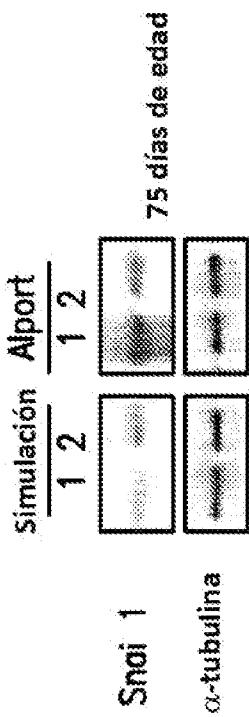


FIG. 14E

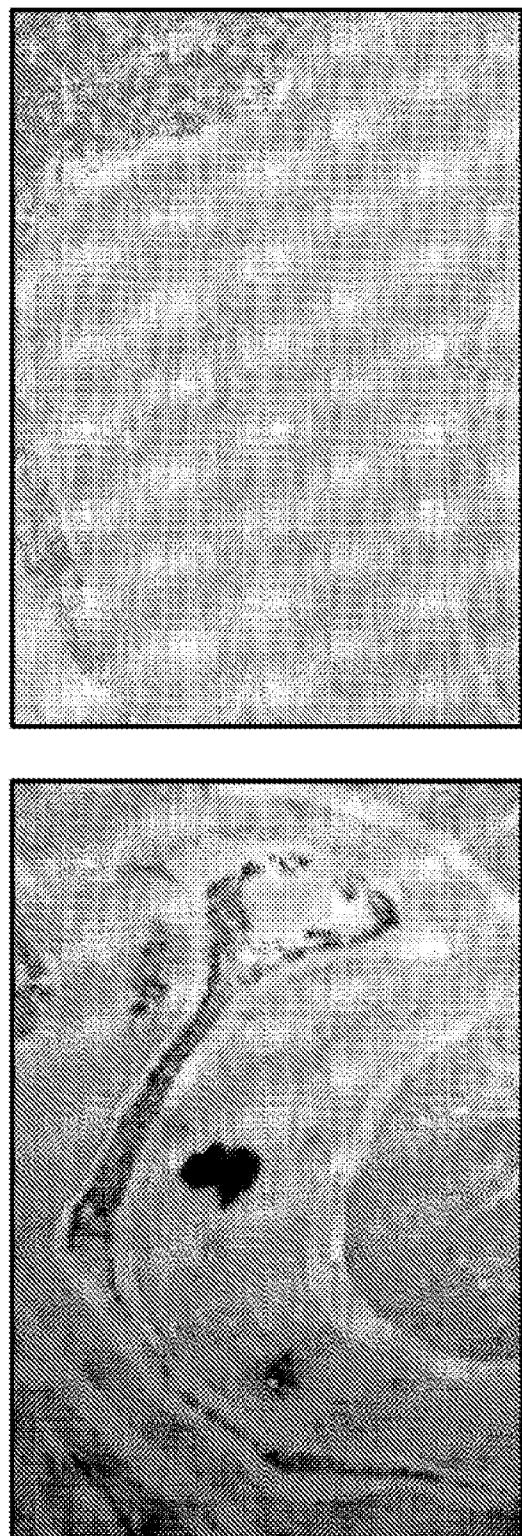


FIG. 15A

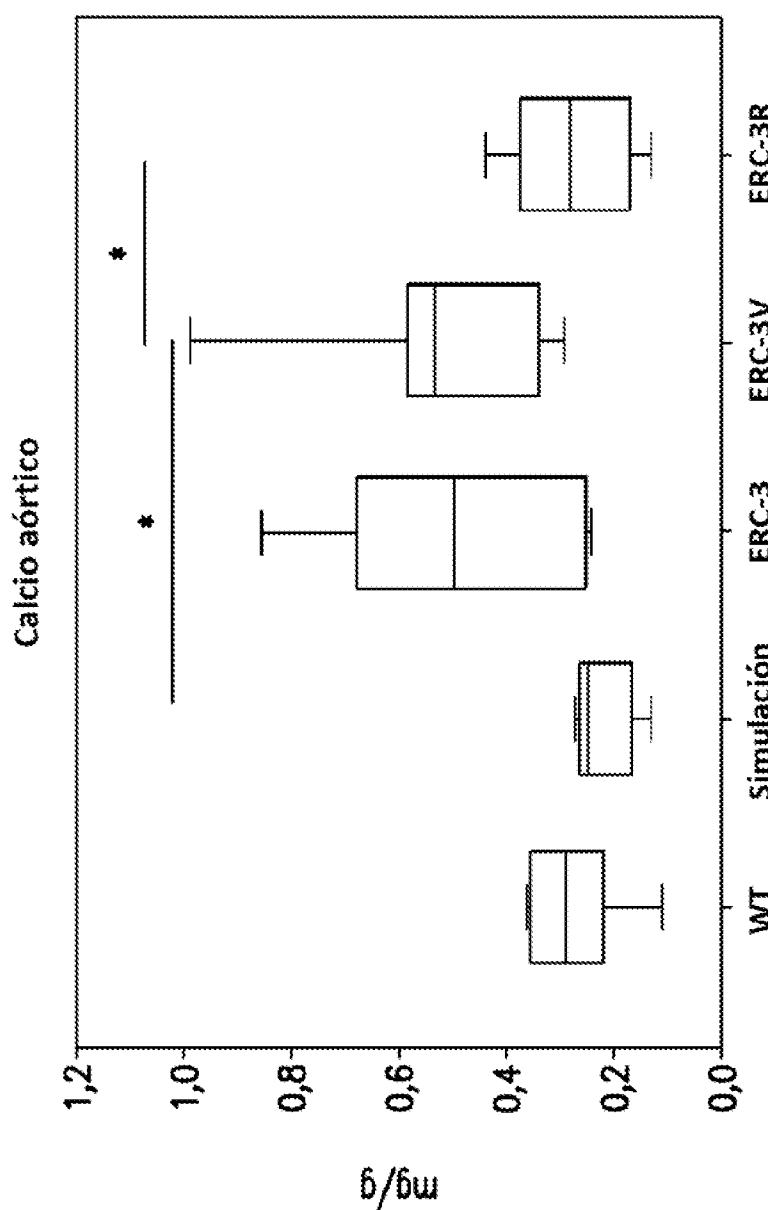


FIG. 15B

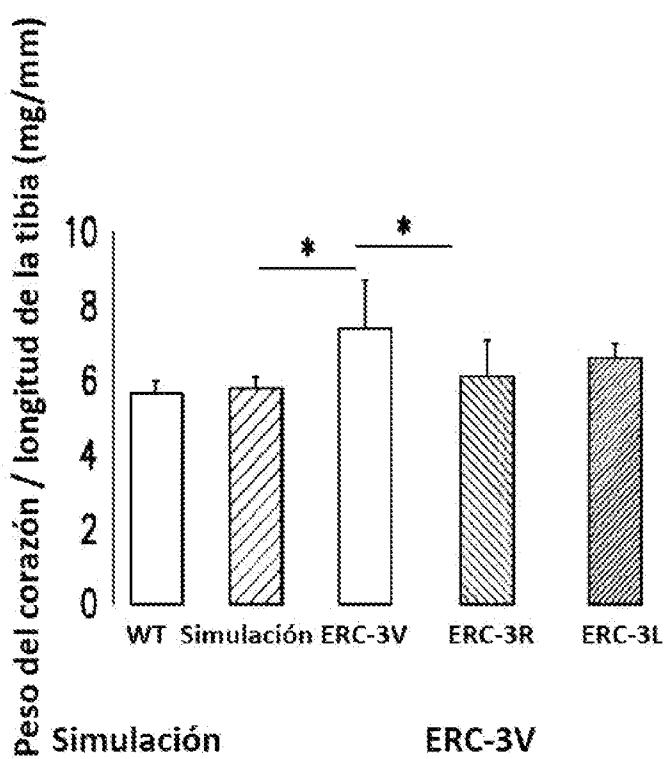


FIG. 16A

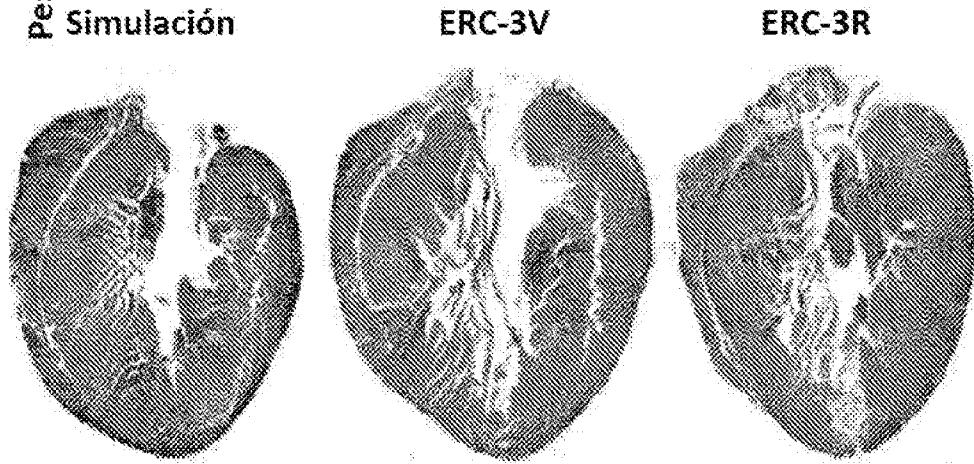


FIG. 16B

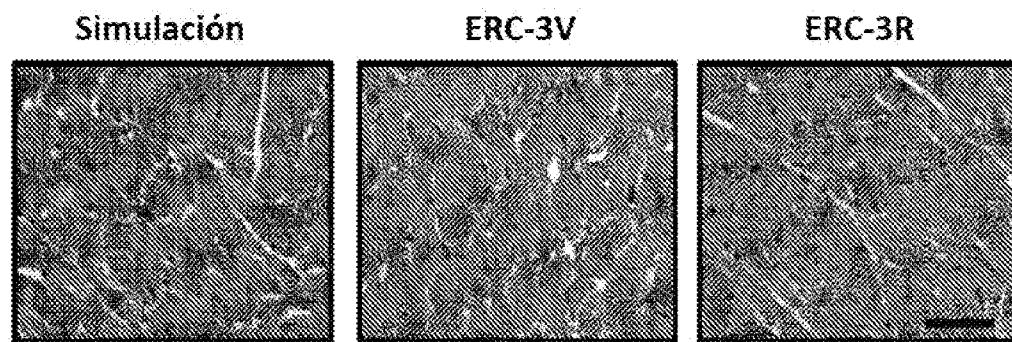


FIG. 16C

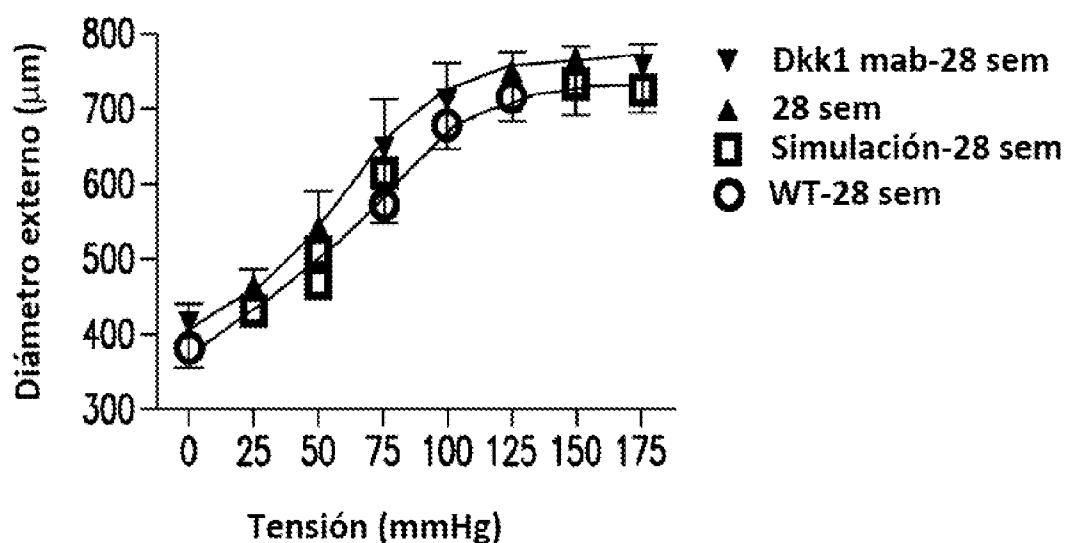


FIG. 17A

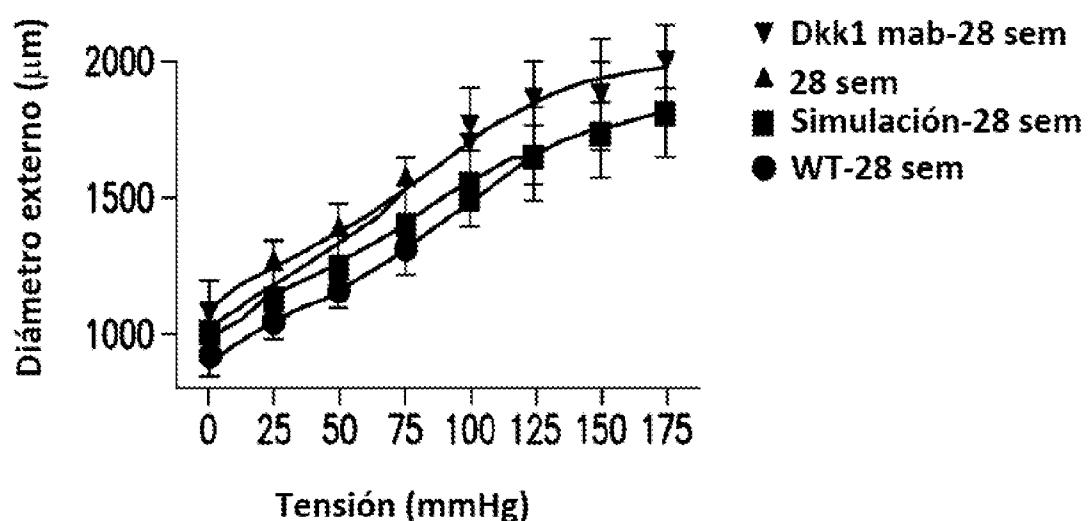


FIG. 17B

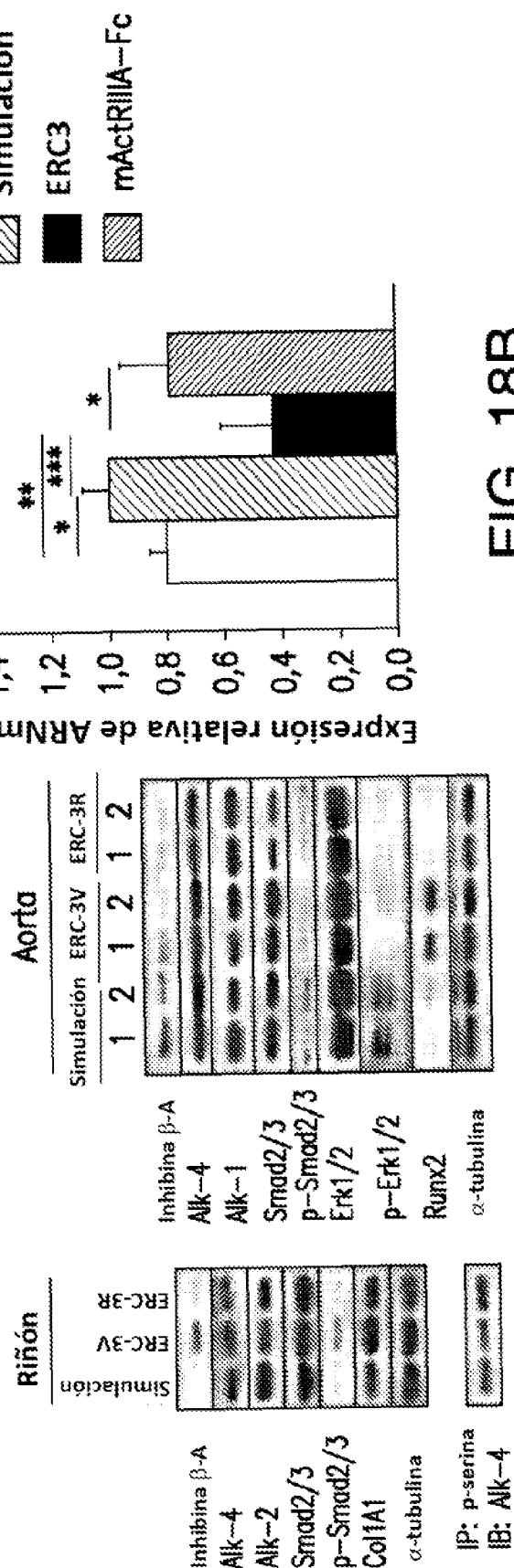


FIG. 18A

FIG. 18B

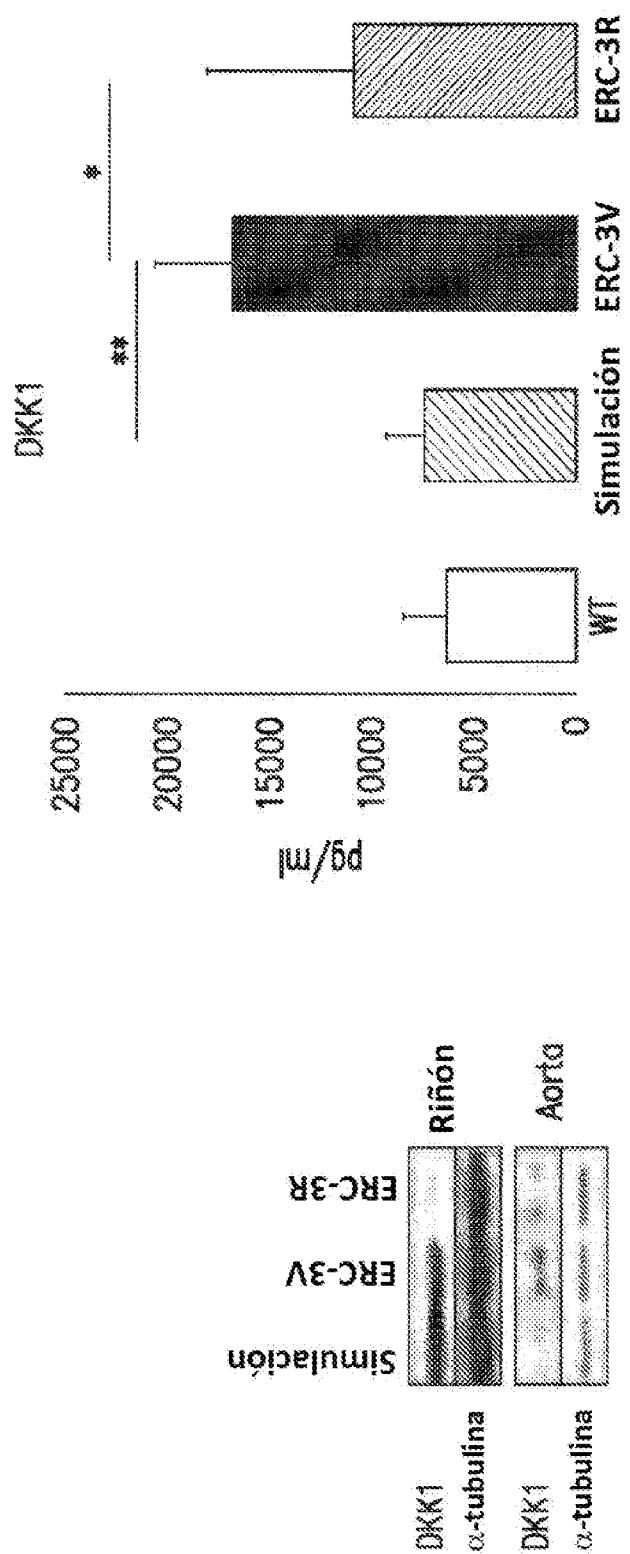


FIG. 18C

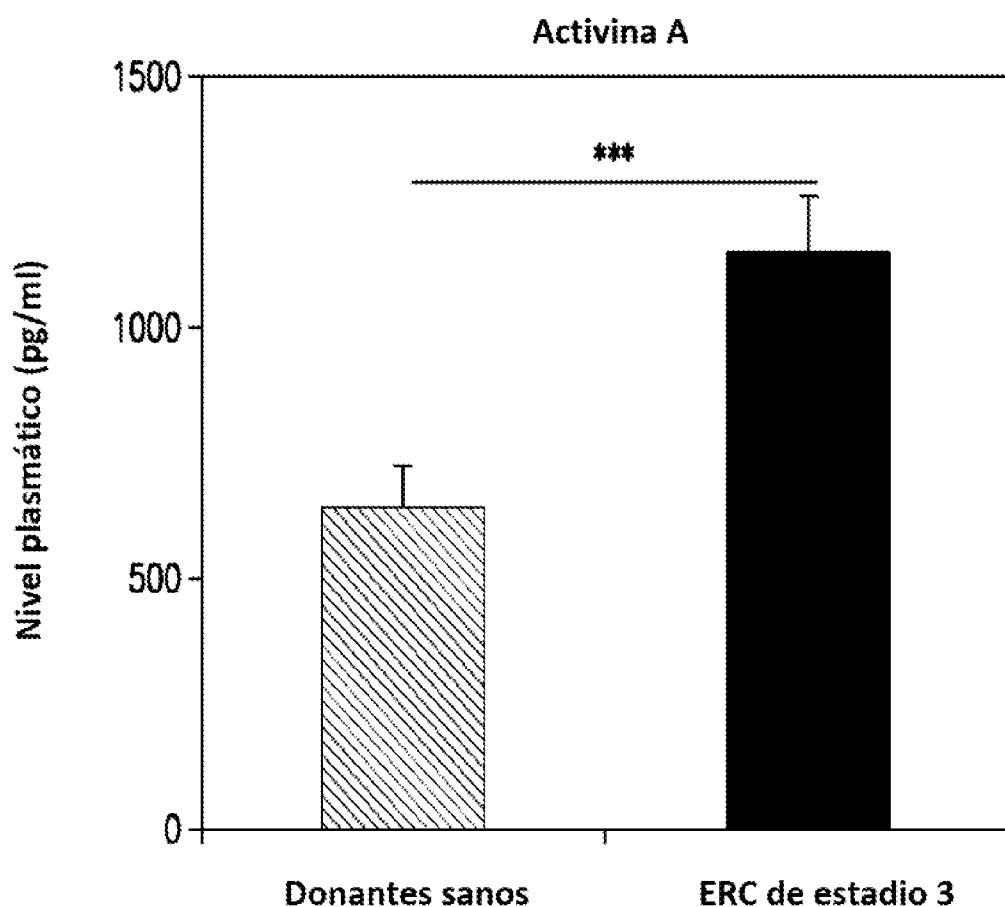


FIG. 19

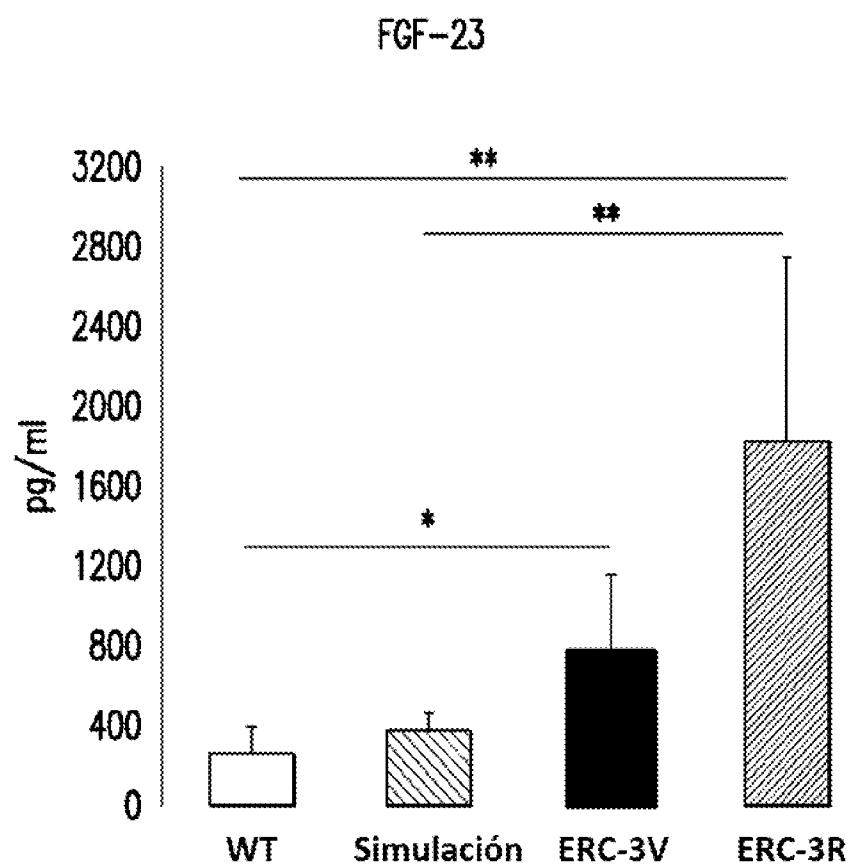


FIG. 20

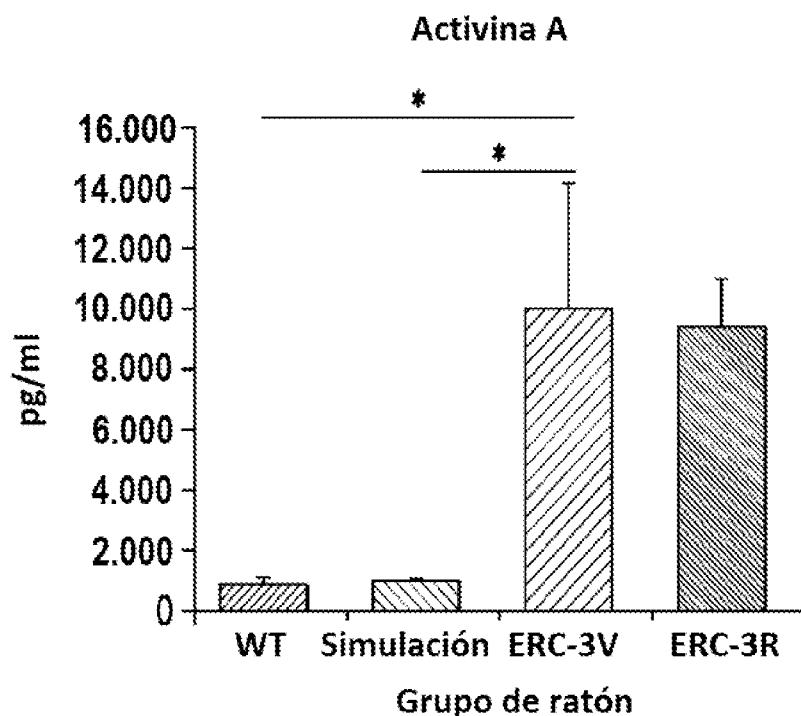


FIG. 21A

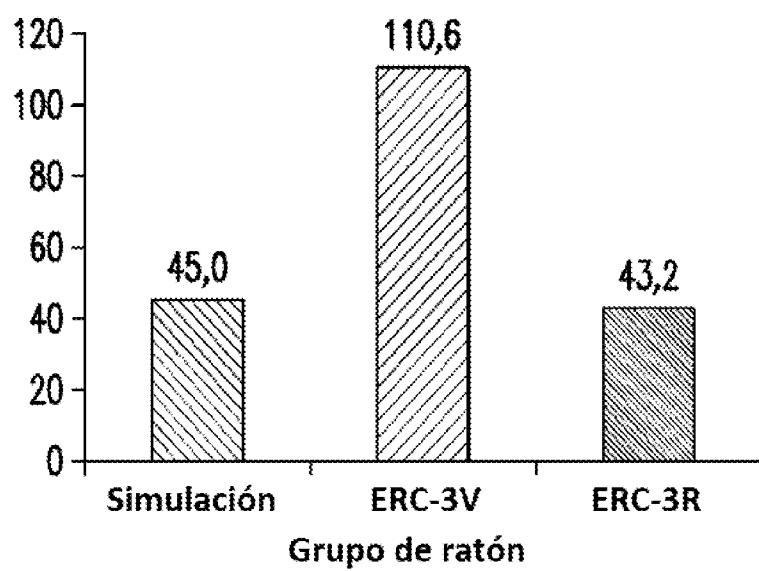


FIG. 21B

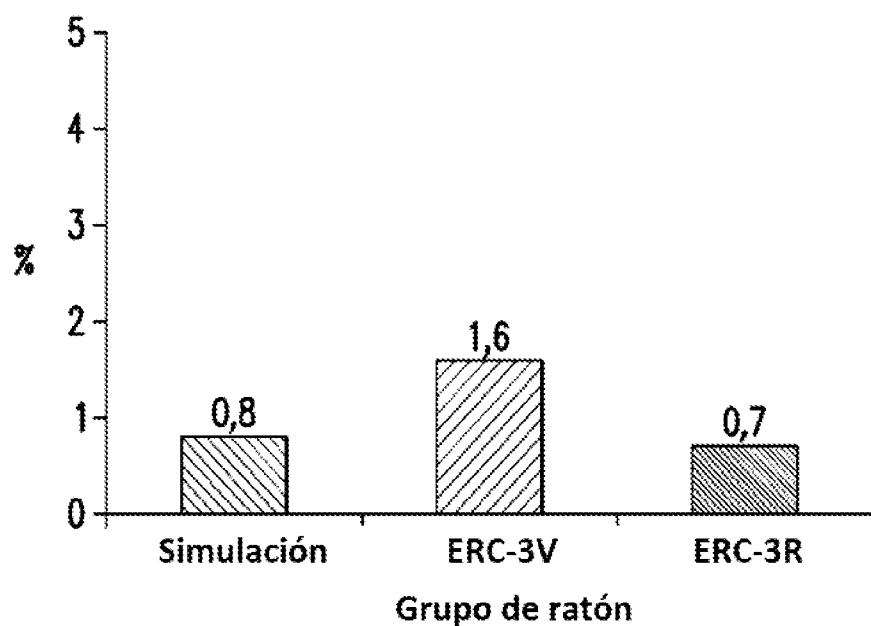


FIG. 21C

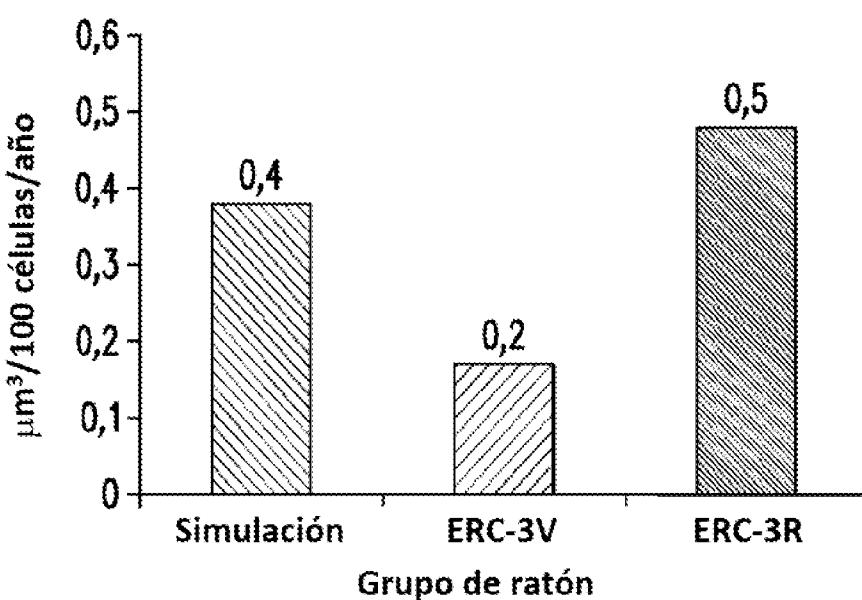
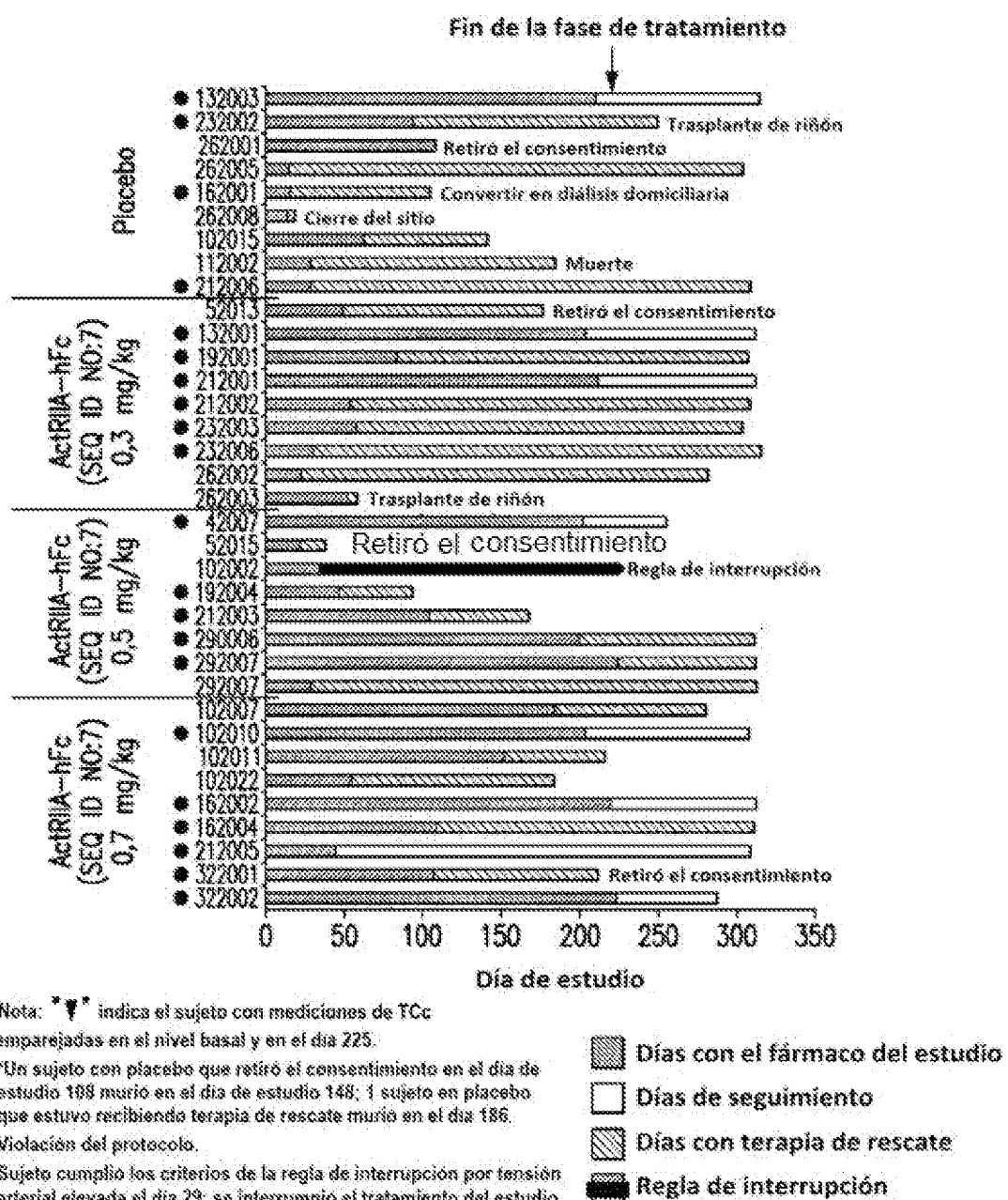


FIG. 21D

**FIG. 22A**

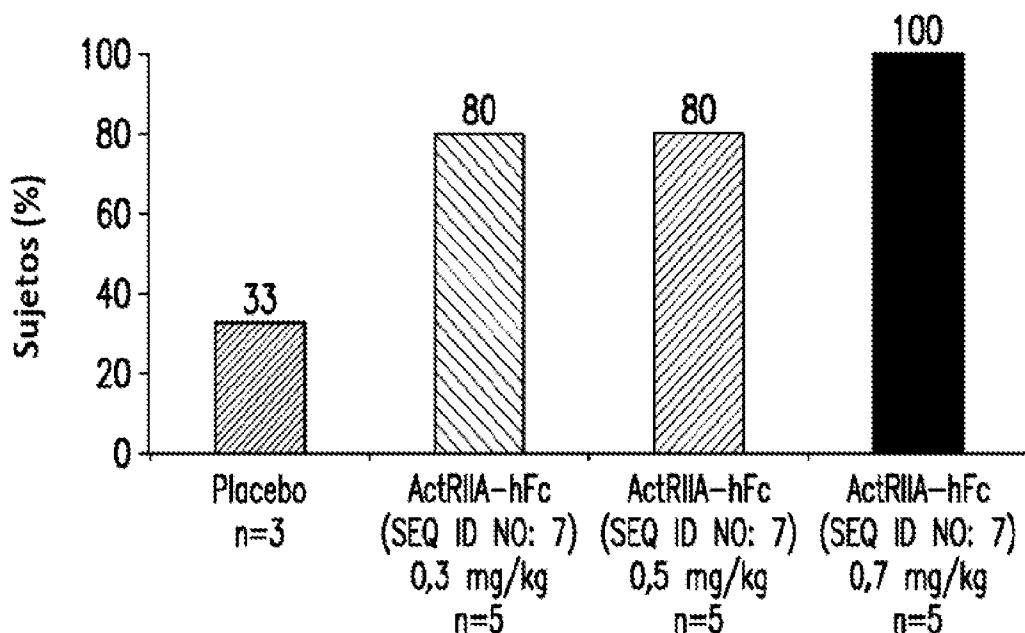


FIG. 22B

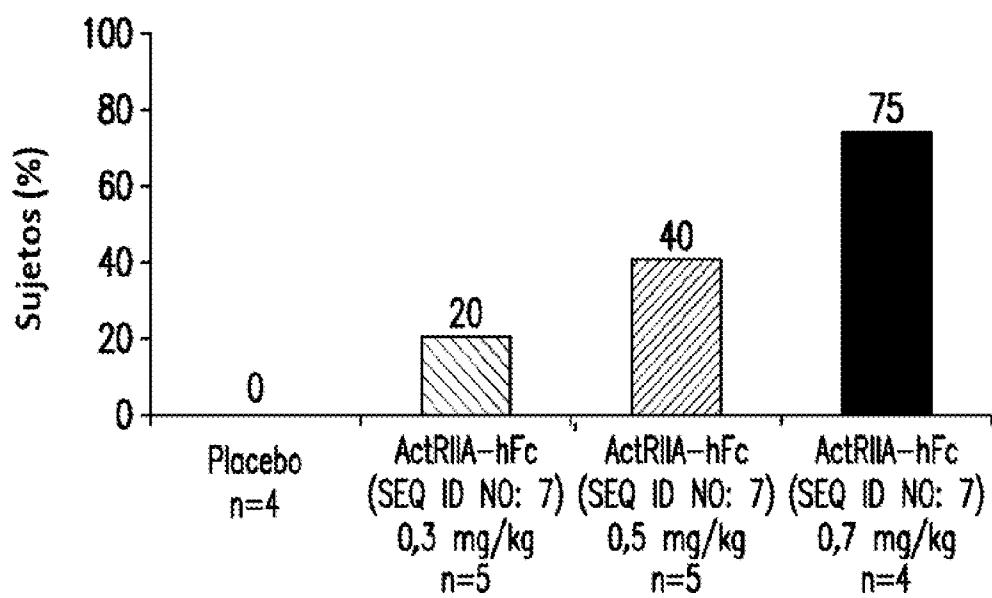
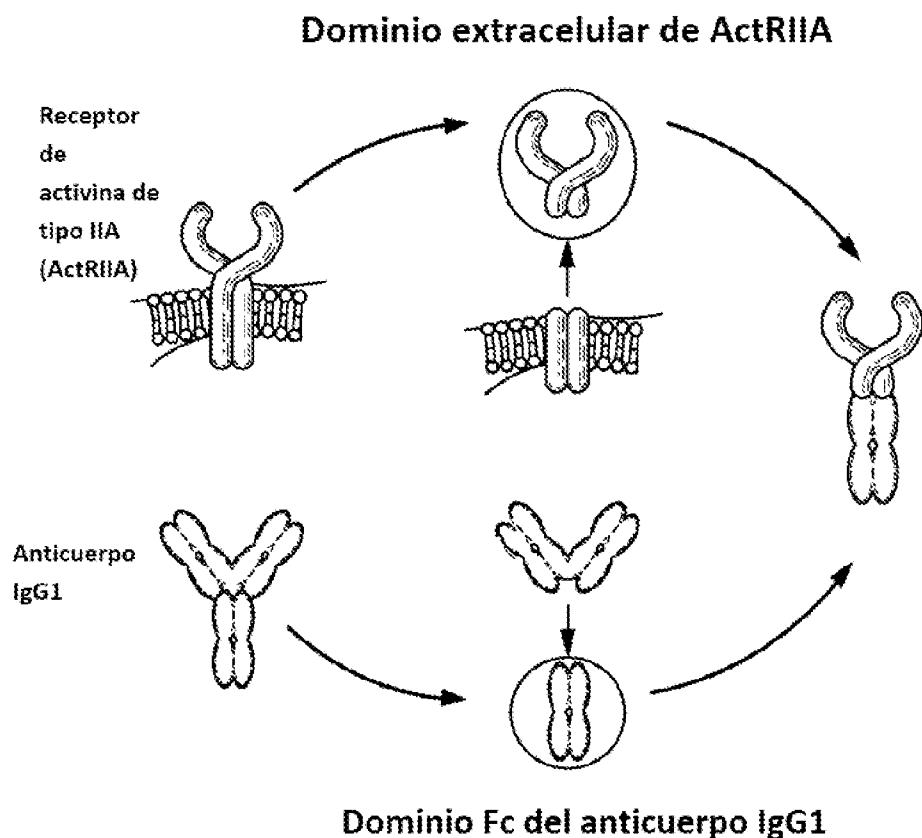
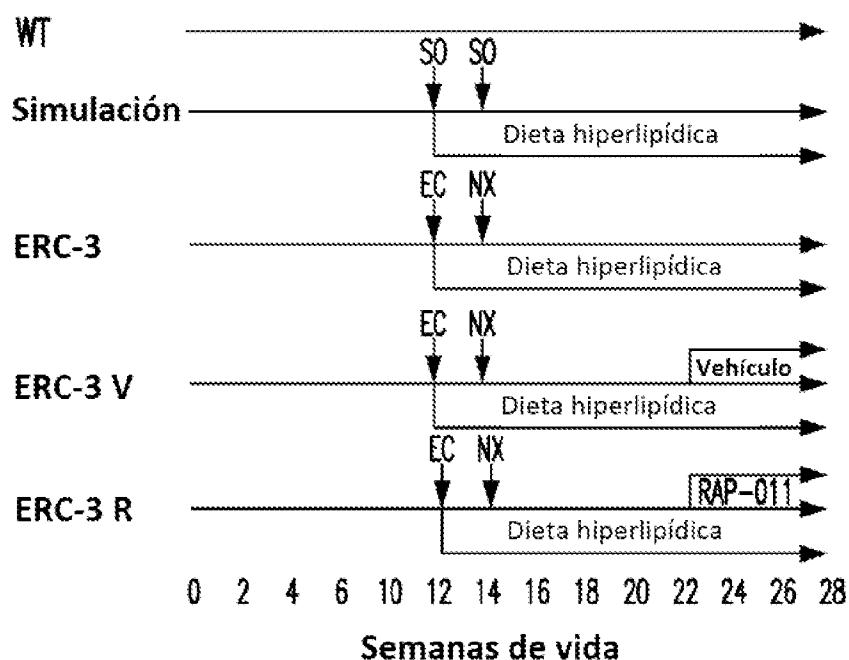


FIG. 22C

**FIG. 23A****FIG. 23B**

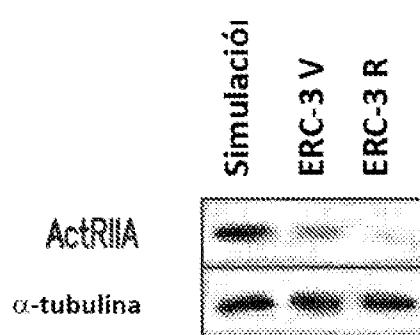


FIG. 24A

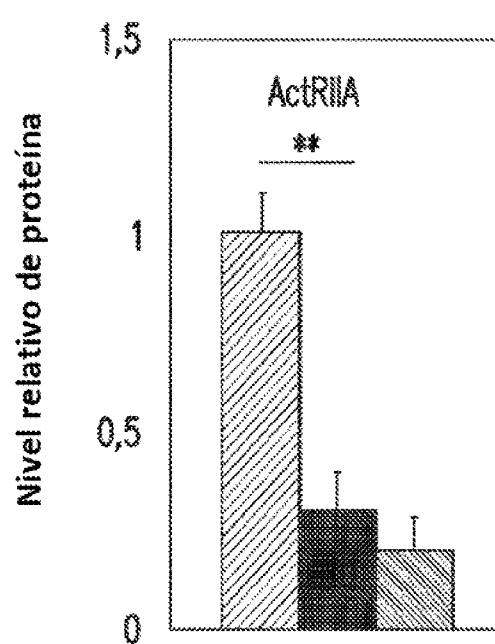


FIG. 24B

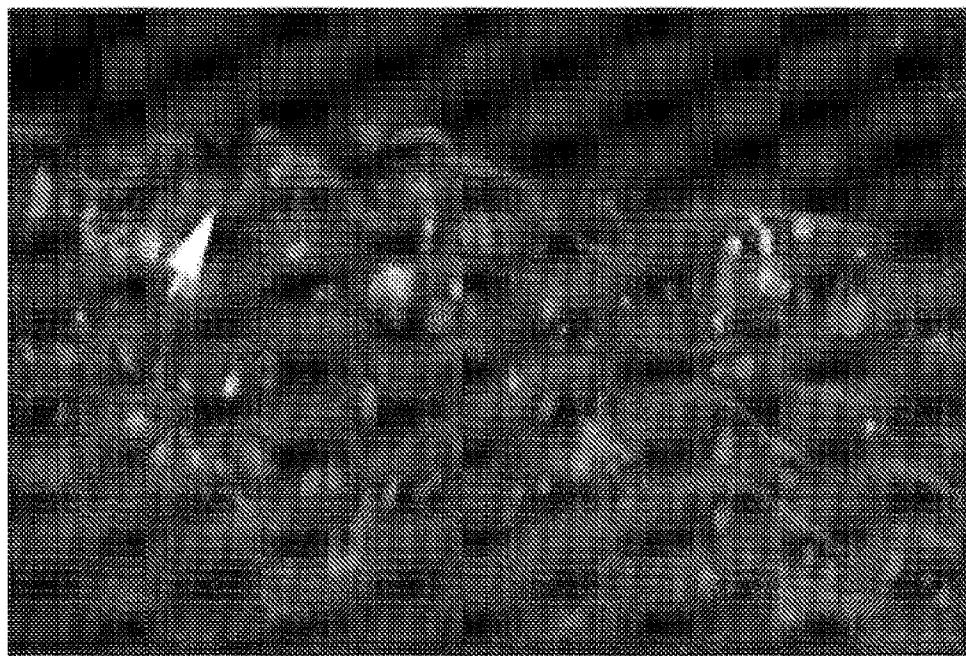


FIG. 24C

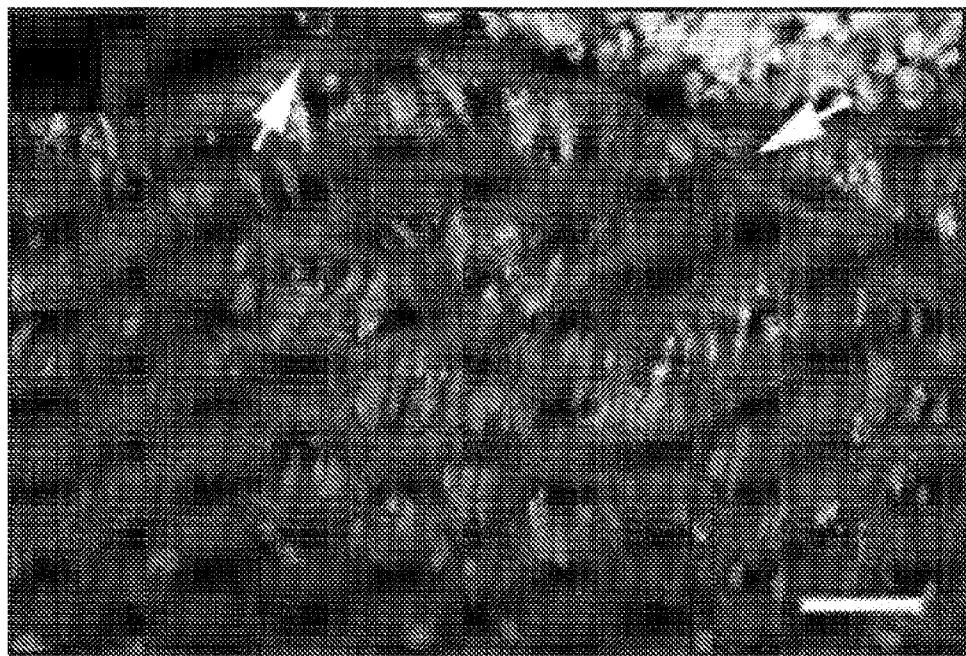


FIG. 24D

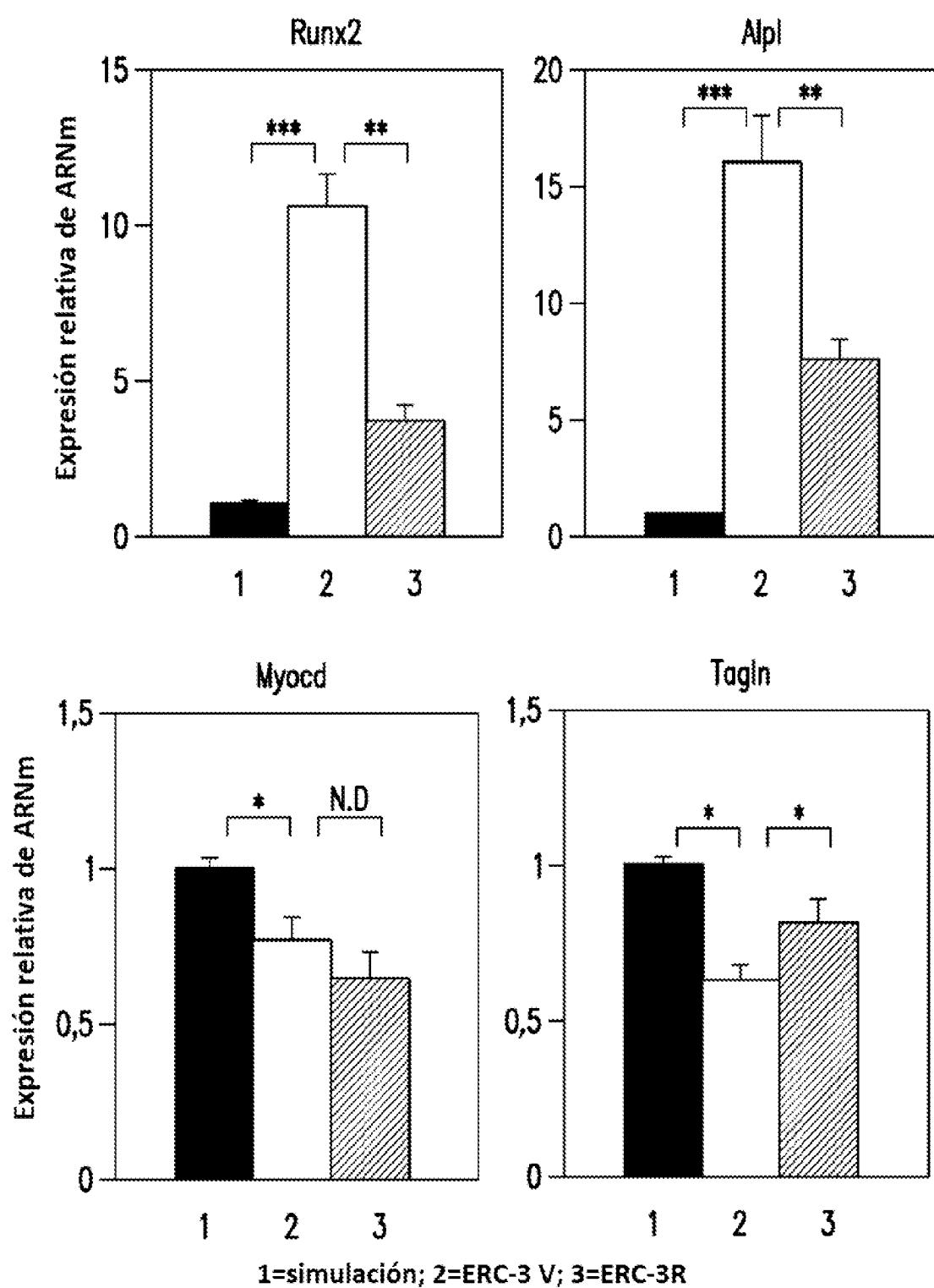


FIG. 25A

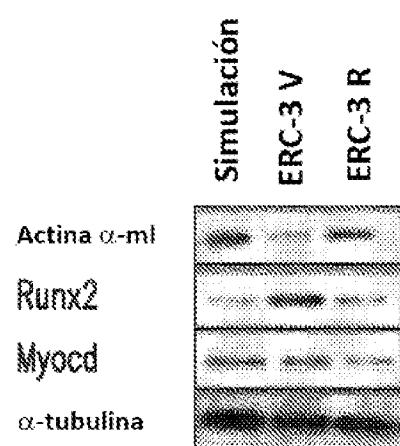
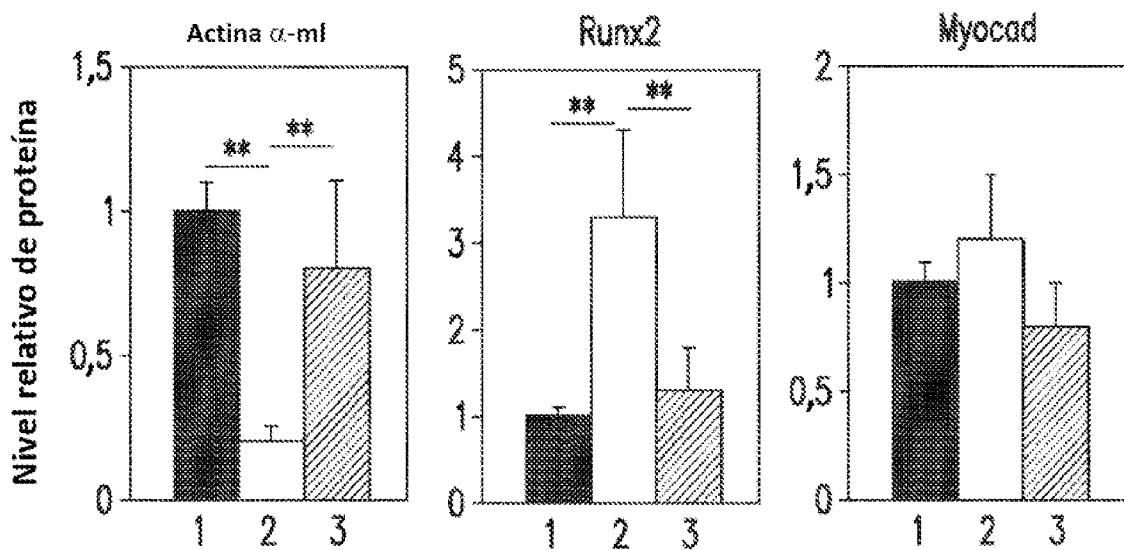
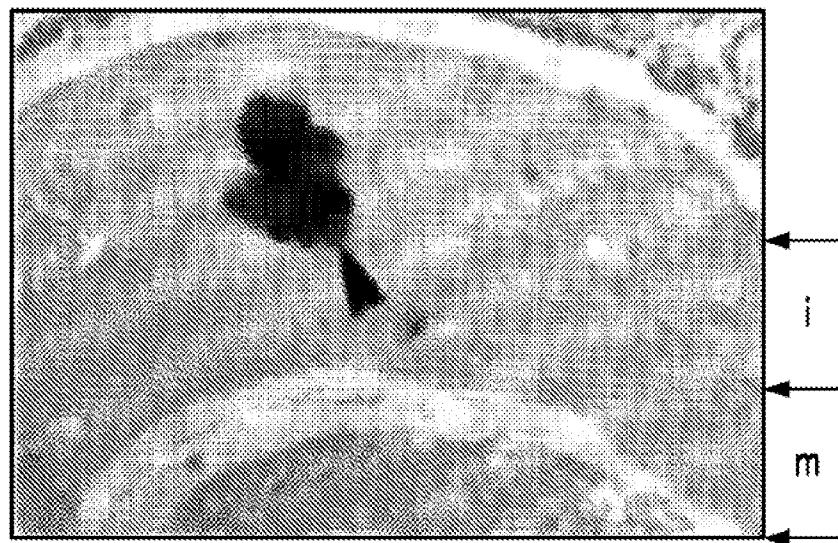


FIG. 25B

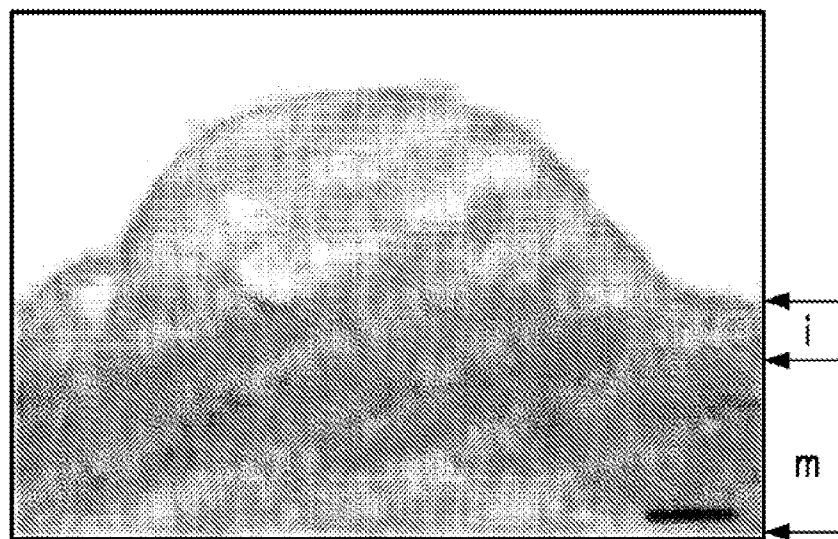


1=simulación; 2=ERC-3 V; 3=ERC-3R

FIG. 25C



ERC-3 V
FIG. 26A



ERC-3 RAP-011
FIG. 26B

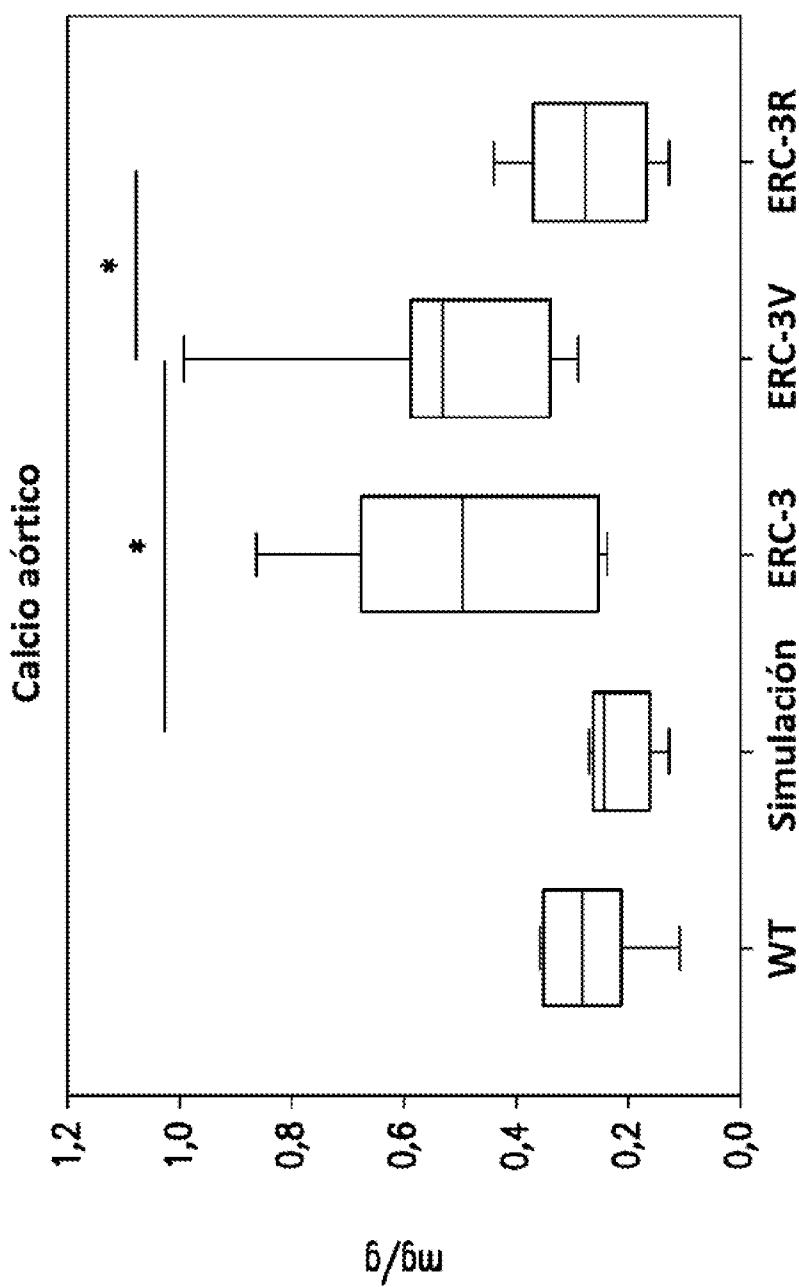


FIG. 26C

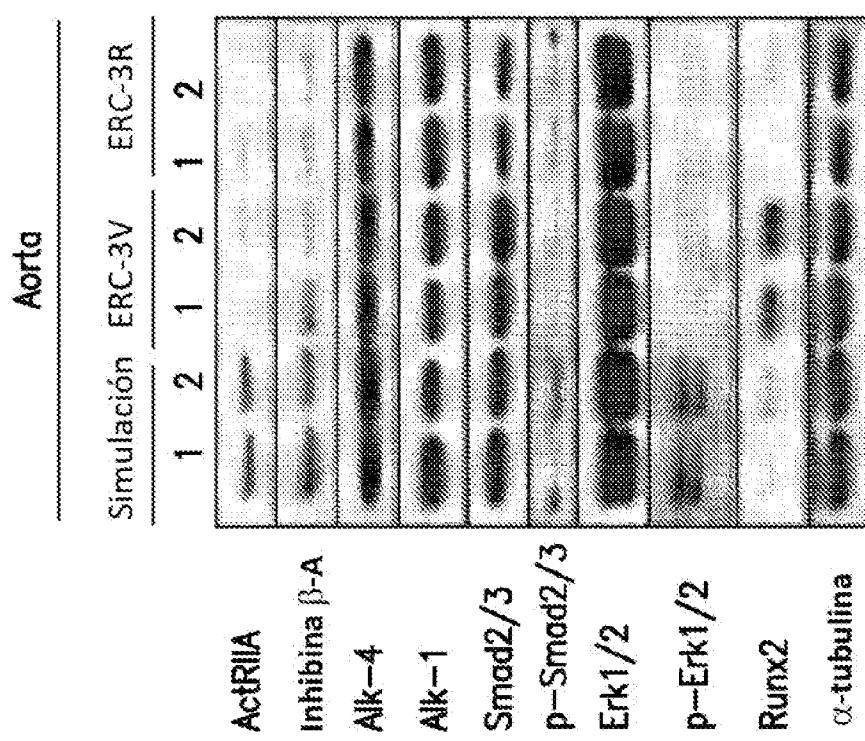


FIG. 27A

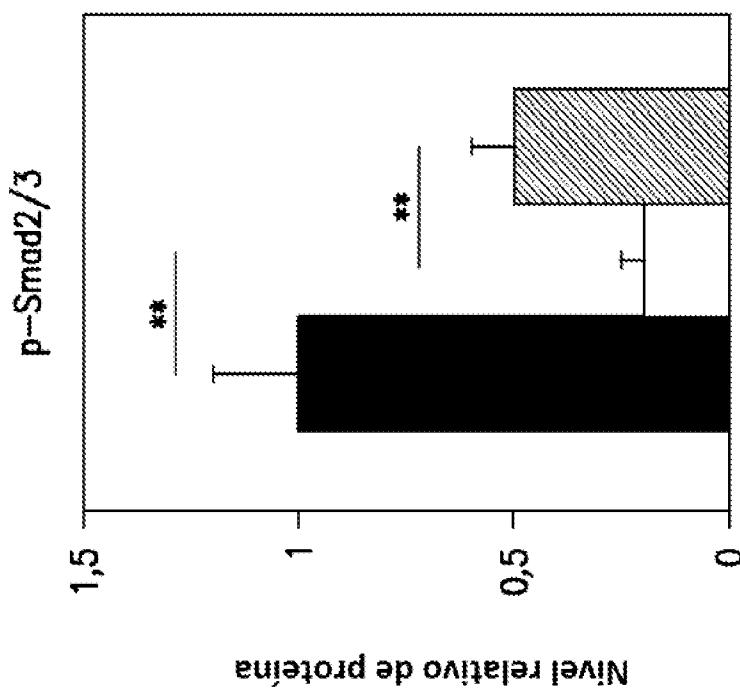


FIG. 27B

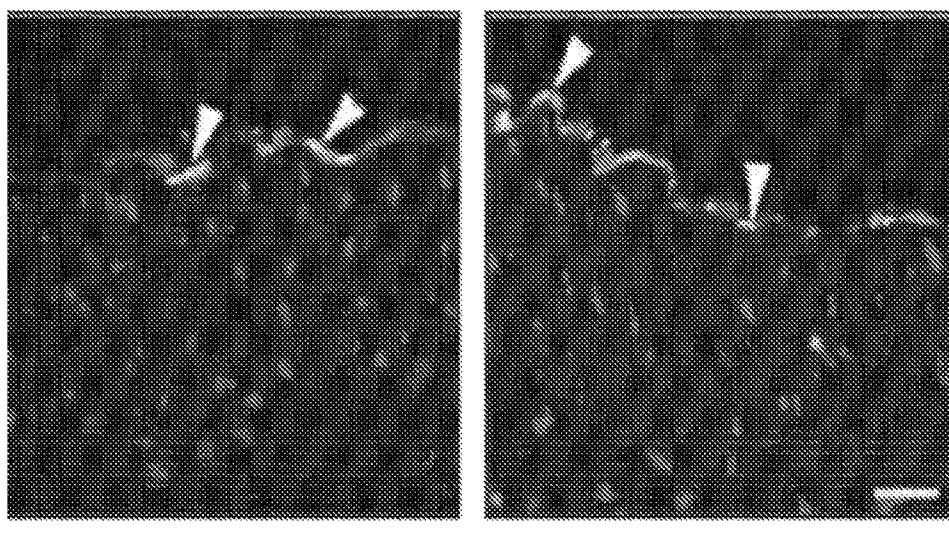


FIG. 28A

FIG. 28B

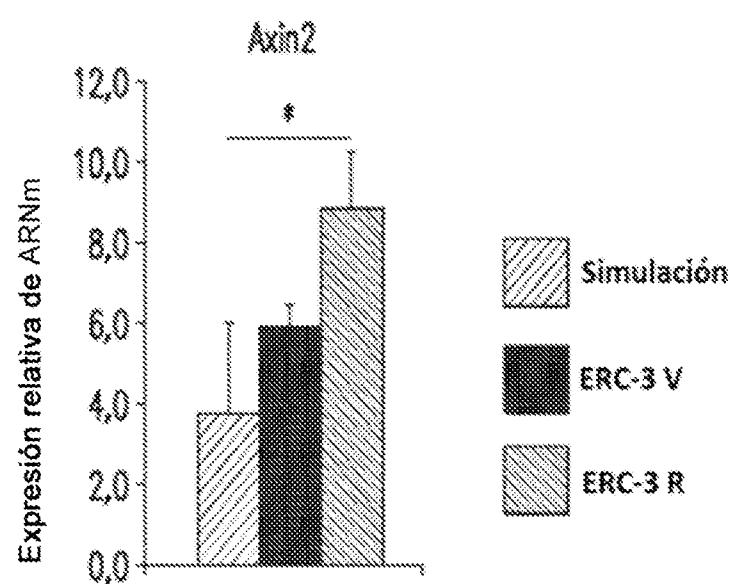


FIG. 28C

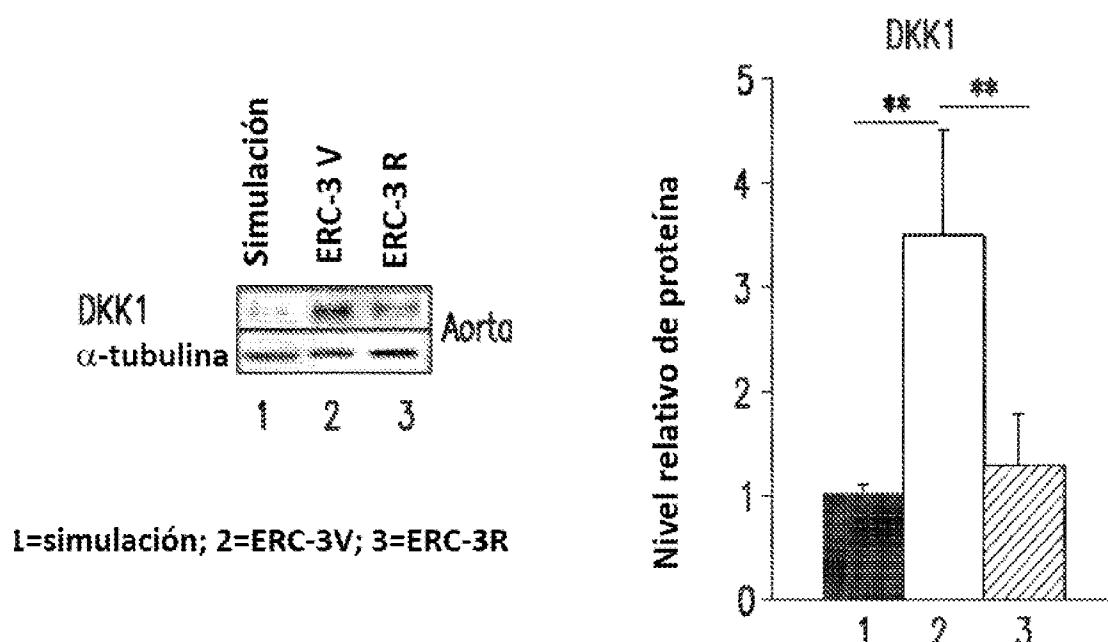


FIG. 28D

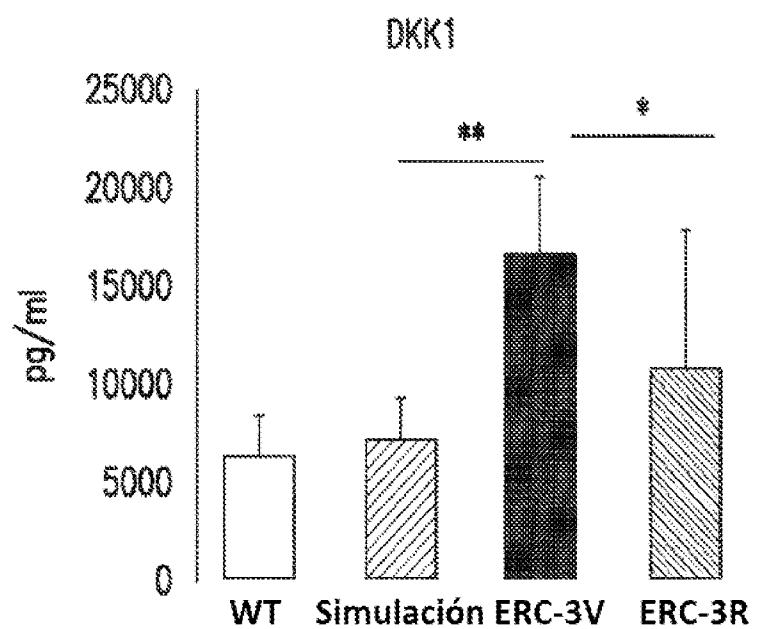


FIG. 28E

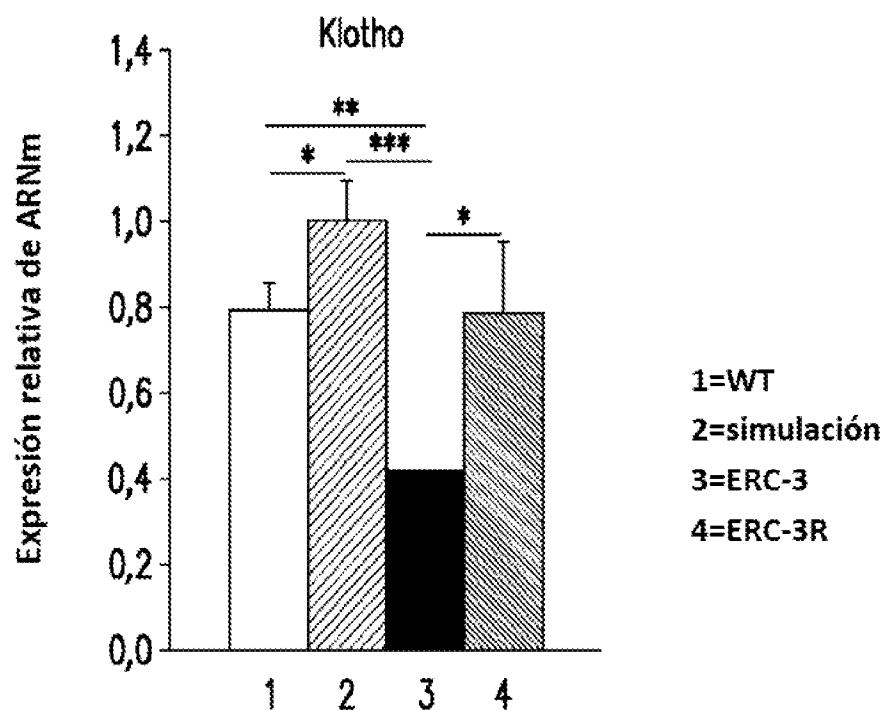


FIG. 29A

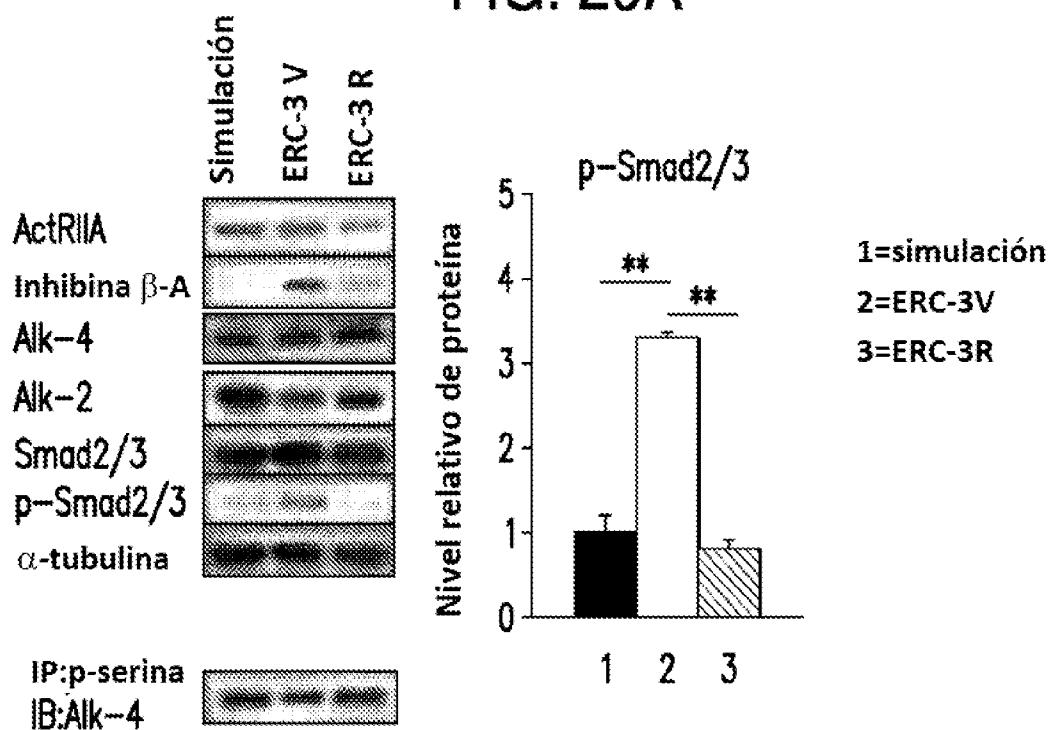


FIG. 29B

FIG. 29C



FIG. 30A

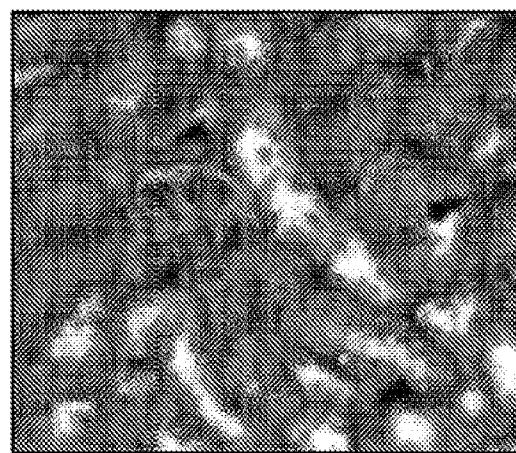


FIG. 30B

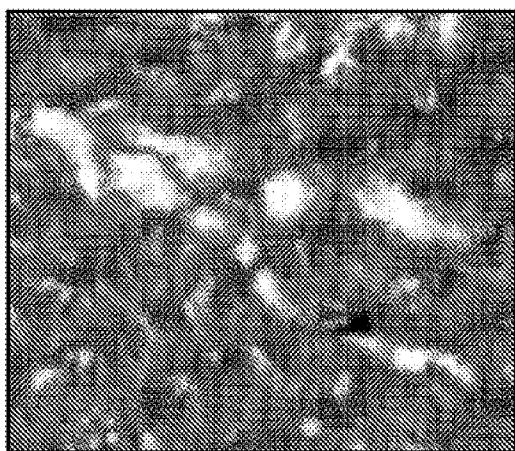


FIG. 30C

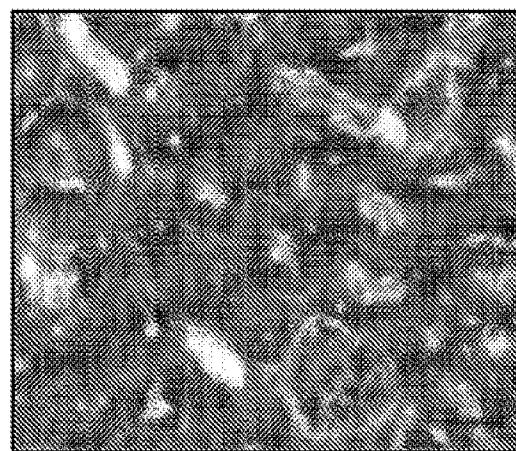


FIG. 30D

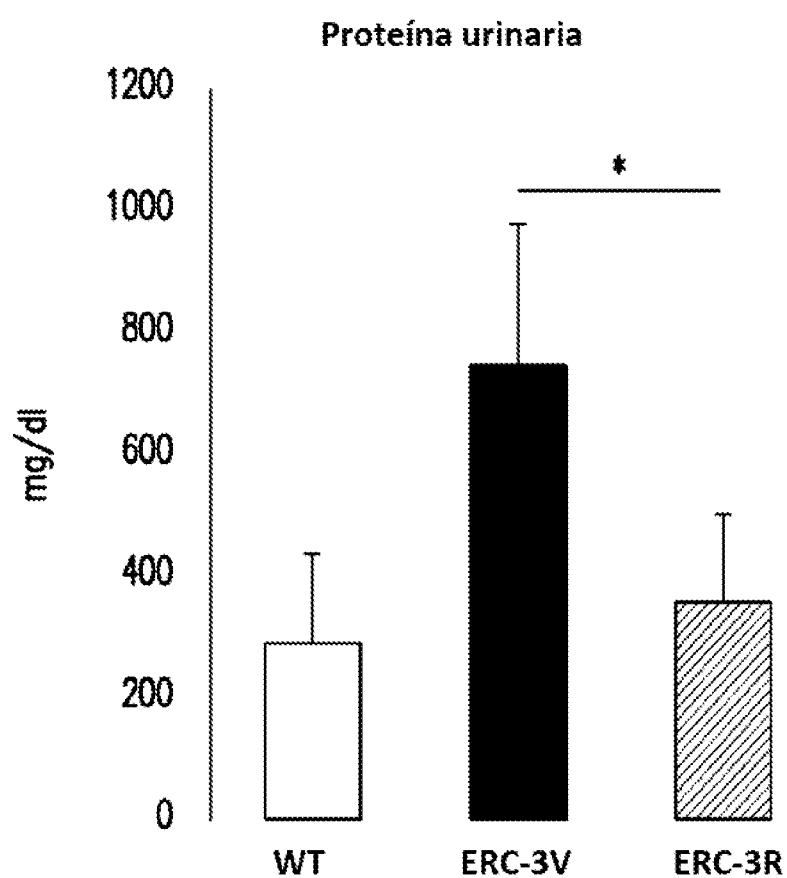


FIG. 30E

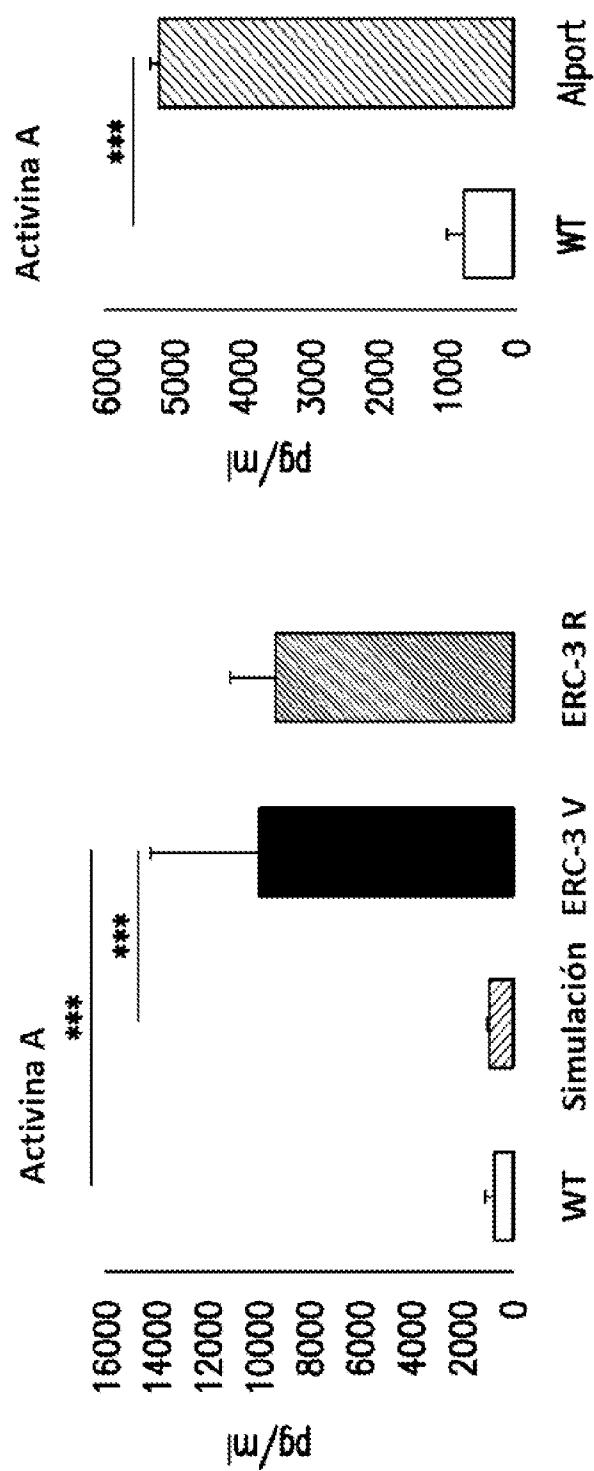


FIG. 31A

FIG. 31B

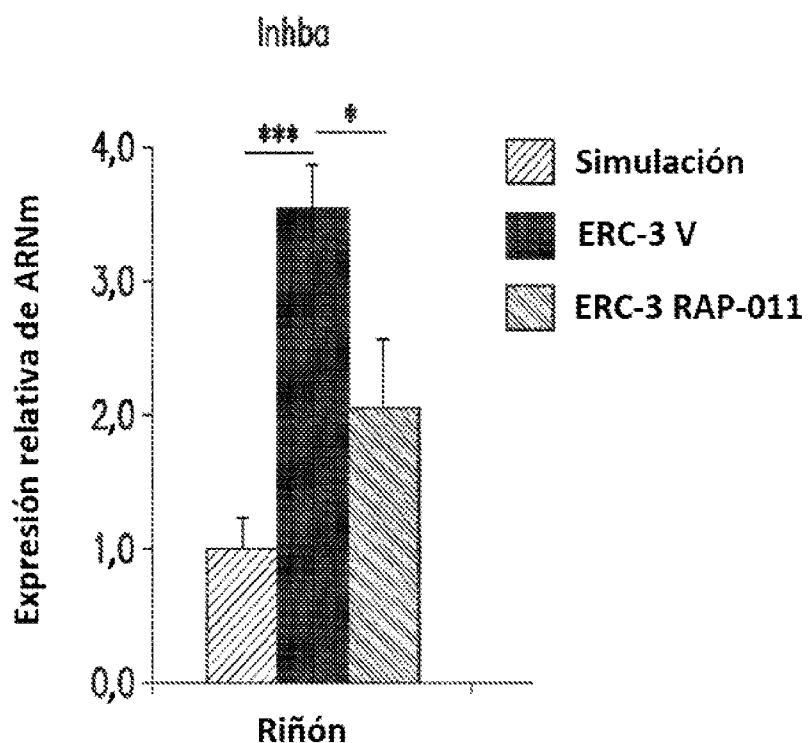


FIG. 31C

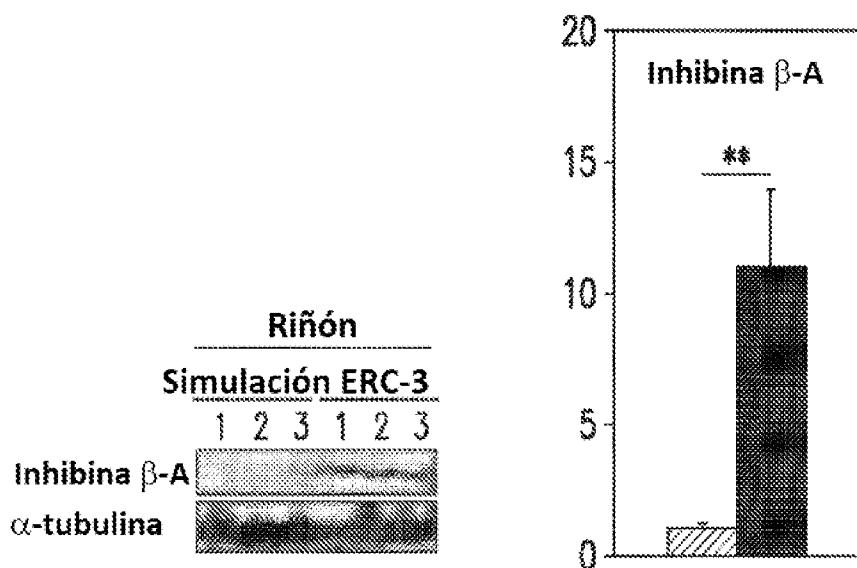


FIG. 31D

FIG. 31E

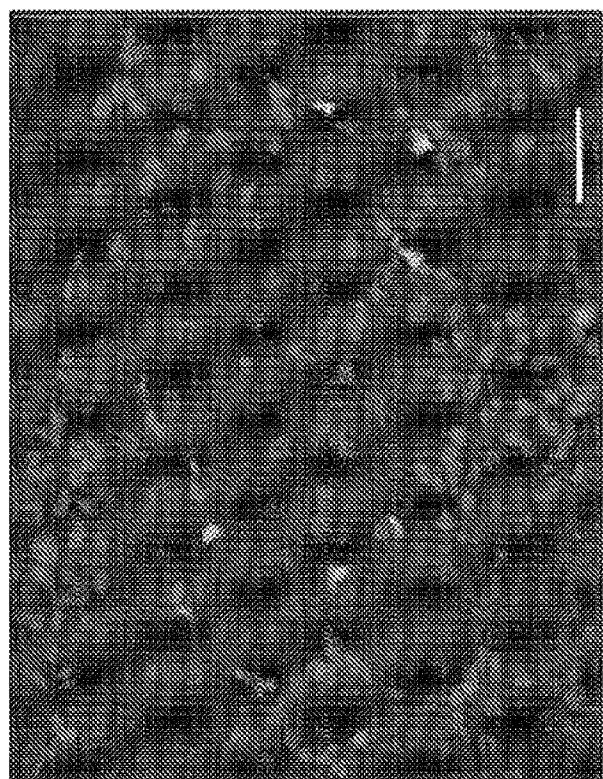


FIG. 32B

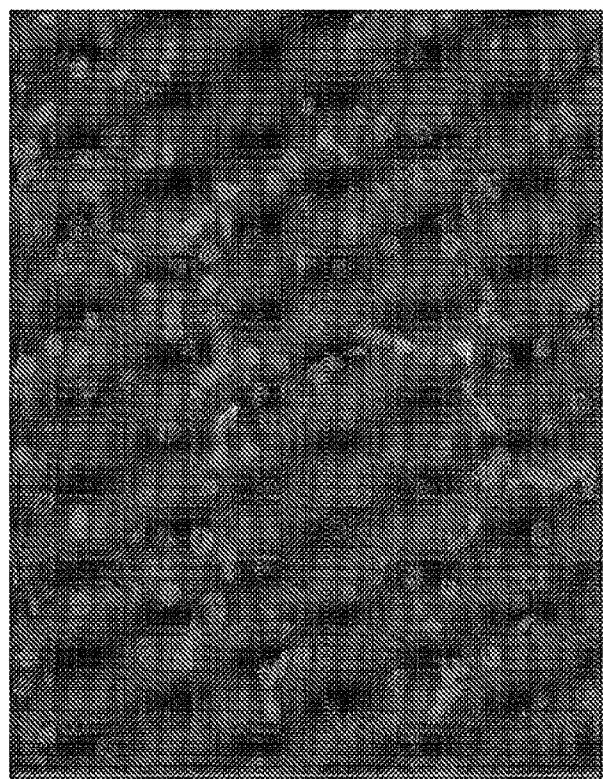


FIG. 32A

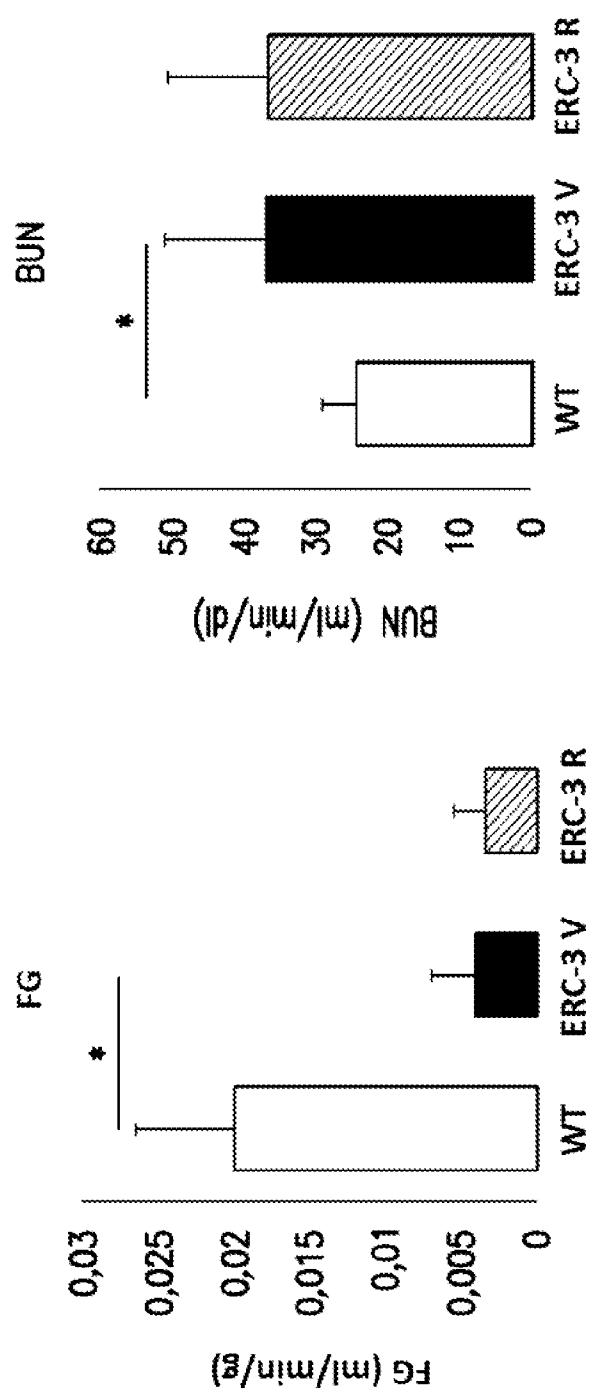


FIG. 33A

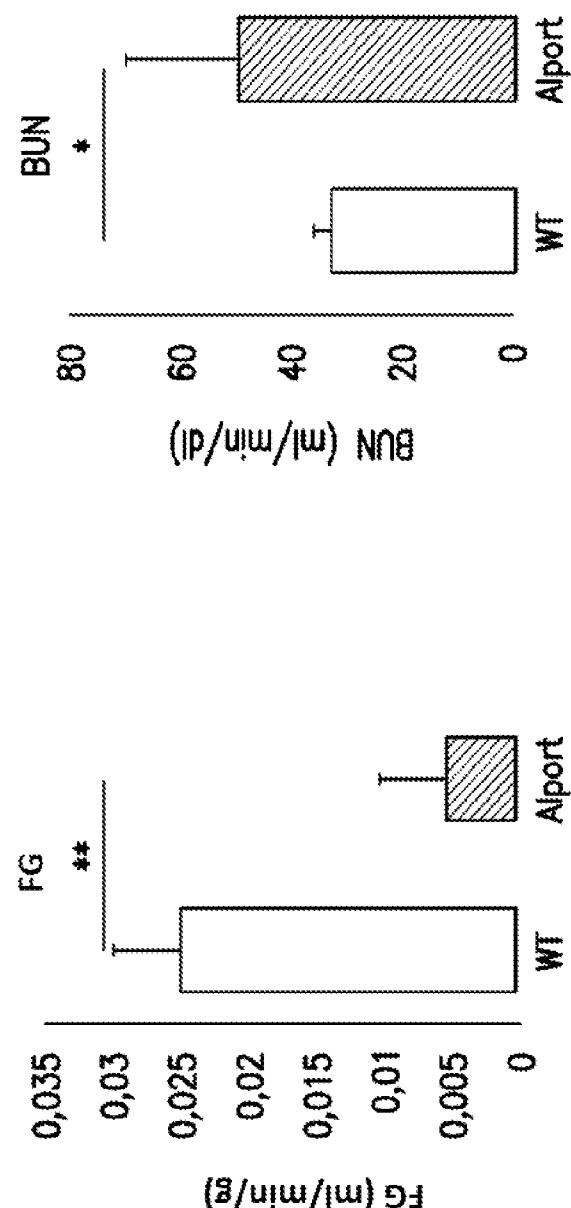


FIG. 33B

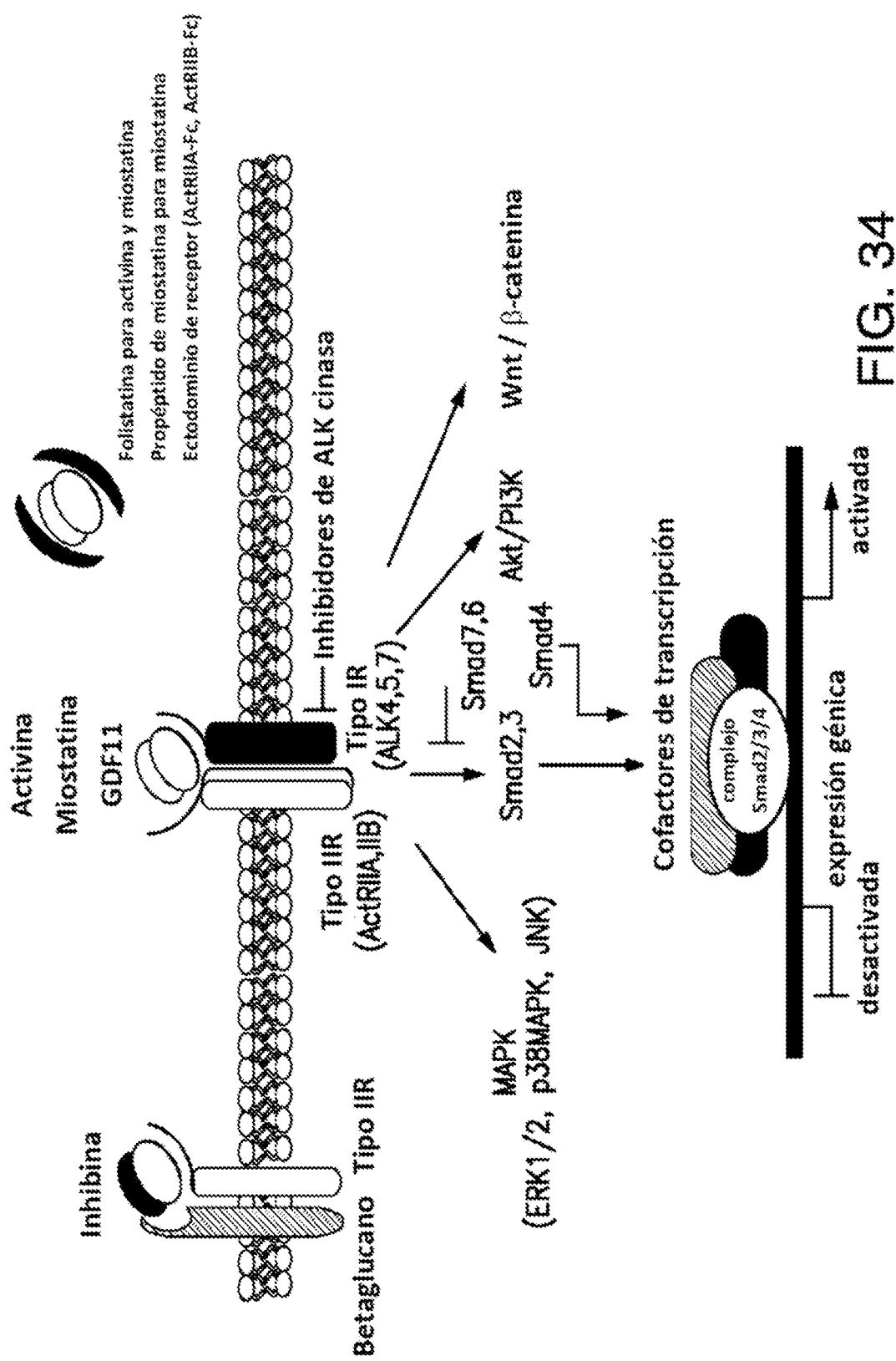


FIG. 34



FIG. 35B

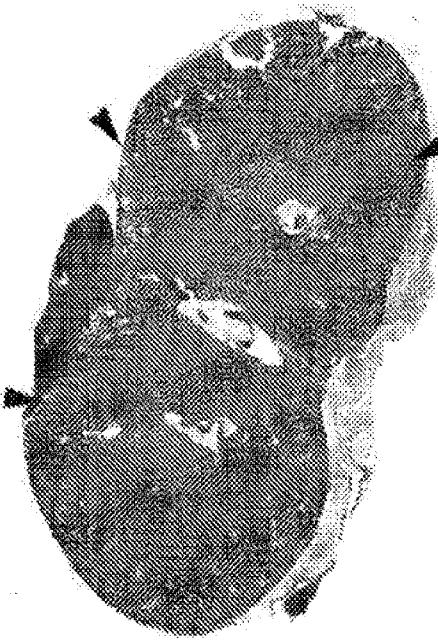


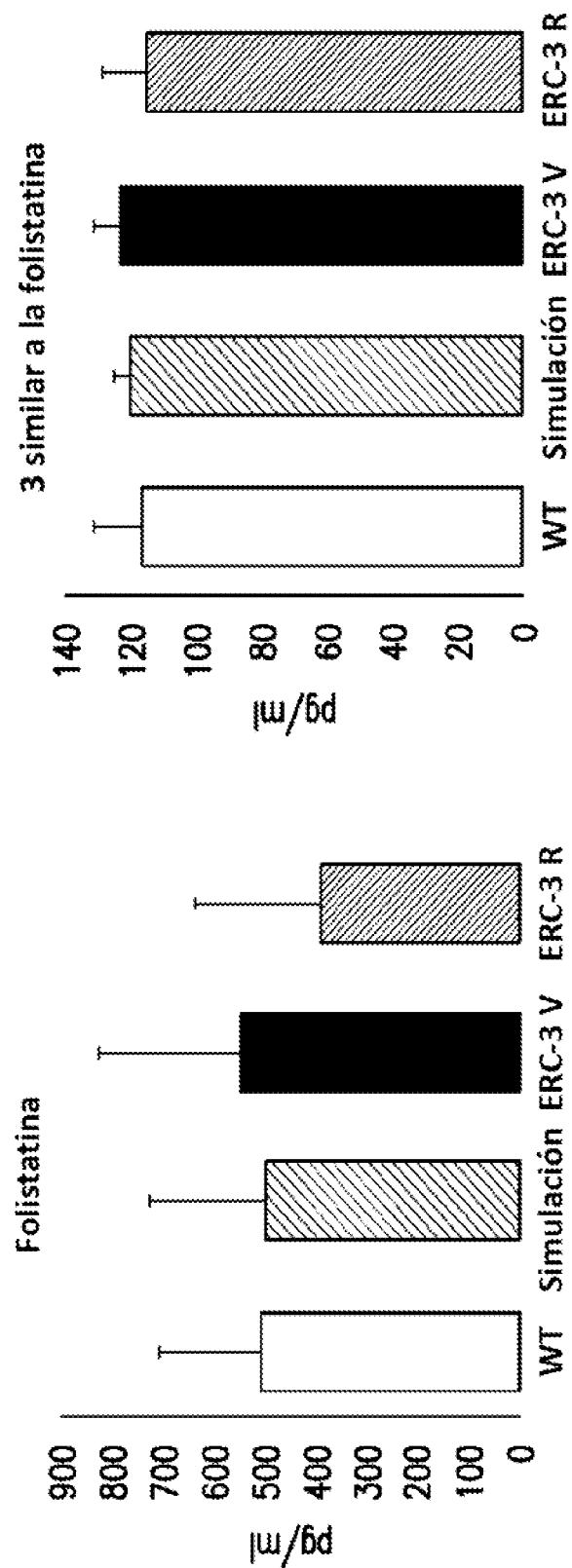
FIG. 35D



FIG. 35A



FIG. 35C



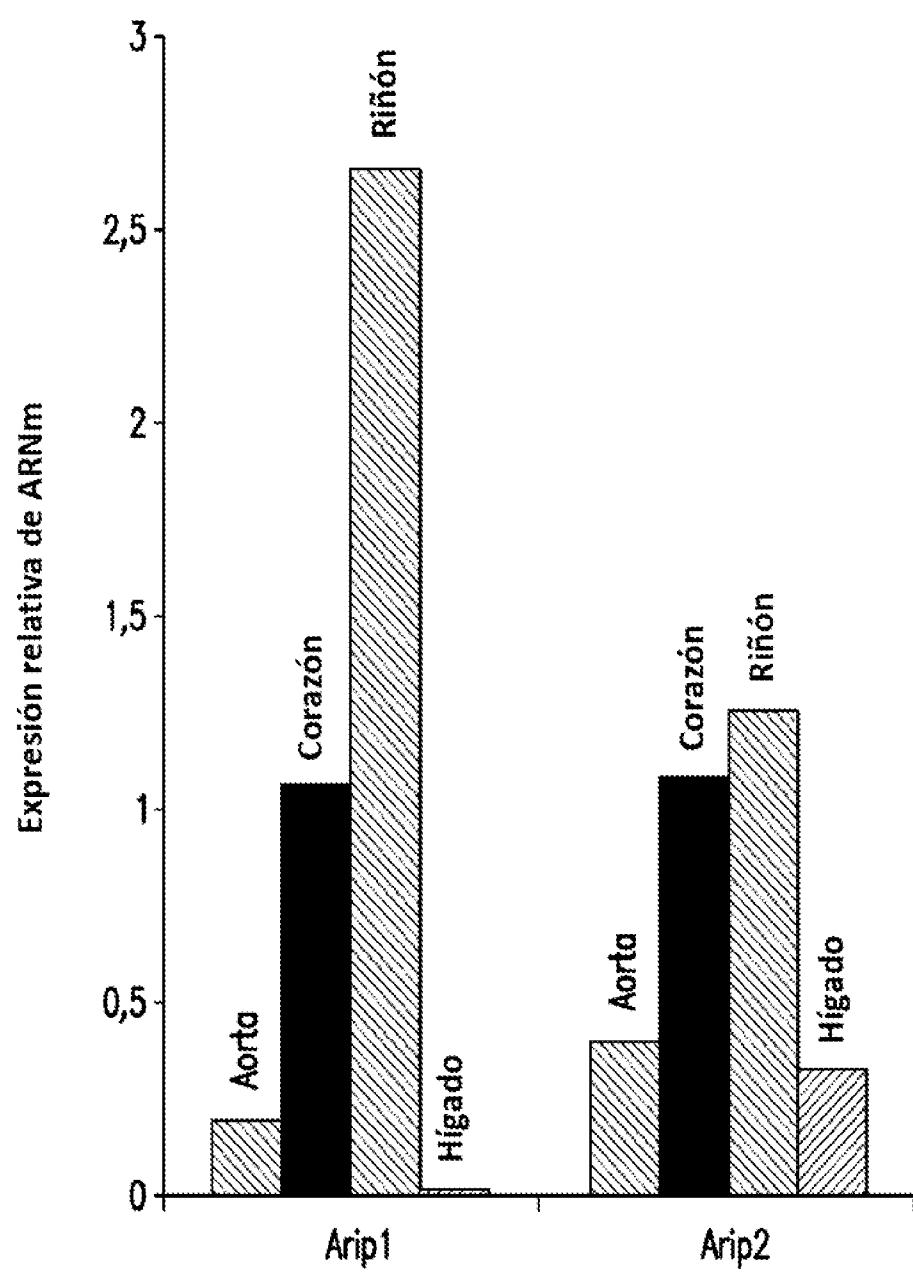


FIG. 37