

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 884 095**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/29 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 17190589 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021 EP 3308796**

(54) Título: **Antagonistas de activina-actrii y usos para el tratamiento de trastornos óseos y otros trastornos**

(30) Prioridad:

02.11.2012 US 201261721898 P
21.12.2012 US 201261740665 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2021

(73) Titular/es:

CELGENE CORPORATION (50.0%)
86 Morris Avenue
Summit, NJ 07901, US y
WASHINGTON UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

SCHORR SLOAN, VICTOR;
HRUSKA, KEITH;
FANG, YIFU;
SUNG, VICTORIA;
STEVENS, RANDALL y
SMITH, WILLIAM

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 884 095 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

Antagonistas de activina-actrii y usos para el tratamiento de trastornos óseos y otros trastornos

1. Introducción

En el presente documento se proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en métodos para el tratamiento de trastornos óseos que están asociados a enfermedad renal, tal como trastorno mineral y óseo asociado a la enfermedad renal crónica ("CKD-MBD"), donde los métodos comprenden la administración de el inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento. En el presente documento también se proporcionan composiciones para su uso en el tratamiento de trastornos óseos de bajo recambio donde los métodos comprenden la administración de inhibidores de Activina-ActRII a un sujeto que necesite el tratamiento. En el presente documento también se proporcionan composiciones para su uso en el tratamiento de trastornos óseos que están asociados a enfermedad renal y composiciones para su uso en el tratamiento de trastornos óseos de bajo recambio y calcificación vascular.

2. Antecedentes

El crecimiento y la mineralización óseos dependen de las actividades de dos tipos de células, los osteoclastos y los osteoblastos, aunque los condrocitos y las células de la vasculatura también participan en aspectos críticos de estos procesos. A nivel de desarrollo, la formación de hueso se produce mediante dos mecanismos, la osificación endocondral y la osificación intramembranosa, siendo el primero responsable de la formación longitudinal del hueso y el último responsable de la formación de huesos topológicamente planos tales como los huesos del cráneo. La osificación endocondral requiere la formación y degradación secuenciales de estructuras cartilaginosas de las placas de crecimiento que sirven como moldes para la formación de osteoblastos, osteoclastos, la vasculatura y la posterior mineralización. Durante la osificación intramembranosa, se forma hueso directamente en los tejidos conjuntivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y posterior deposición en la matriz.

La enfermedad renal crónica está asociada a un deterioro progresivo de la homeostasis mineral, con una alteración de las concentraciones de fósforo y calcio normales en el suero y los tejidos, y a cambios en las hormonas circulantes, tales como la hormona paratiroidea, la 25-hidroxivitamina D, la 1,25-dihidroxivitamina D, otros metabolitos de la vitamina D, el factor de crecimiento fibroblástico 23 y la hormona del crecimiento. Véase, Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, In: Kidney Int Suppl. (2009) 76 (Suppl 113):S1-130, página S3. La homeostasis mineral y hormonal alterada en la enfermedad renal crónica es crítica para la formación inicial de hueso durante el crecimiento (modelado óseo) y para la estructura y función del hueso durante la edad adulta (remodelado óseo). Como resultado, los pacientes con enfermedad renal crónica presentan anomalías óseas. Además, de forma similar, debido a la alteración de las funciones mineral y endocrina, los pacientes con enfermedad renal crónica pueden presentar calcificación extraesquelética. Estos síndromes se denominan trastornos minerales y óseos asociados a la enfermedad renal crónica («CDK-MBD»).

El hueso experimenta un recambio constante. El recambio óseo es el proceso de resorción y posterior sustitución de hueso. Los osteoblastos y osteoclastos son las células necesarias para el recambio óseo. La enfermedad ósea de bajo recambio y la enfermedad ósea adinámica se caracterizan por una resorción y sustitución de hueso reducidas o inexistentes. Los CKD-MBD se pueden caracterizar por un bajo recambio o huesos adinámicos. (Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, In: Kidney Int Suppl. (2009) 76 (Suppl 113):S1-130, página S34).

El aumento de los niveles de calcio en la vasculatura puede derivar en calcificación vascular, una afección caracterizada por un mayor endurecimiento de los vasos. Los pacientes con calcificación vascular tienen mayor riesgo de sufrir infarto de miocardio y la calcificación vascular es especialmente prevalente en pacientes que sufren enfermedades renales, por ejemplo, CKD-MBD. Véase, p. ej., Shanahan y col., 2011, Circ. Res. 109:697-711.

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

3. Resumen

La invención proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en un método para tratar el trastorno mineral y óseo asociado a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD) en un sujeto, donde dicho inhibidor de ActRII es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

- 55 a) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2;

- b) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2;
- c) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:2;
- d) SEQ ID NO:2;
- e) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:3;
- 5 f) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:3;
- g) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:3;
- h) SEQ ID NO:3;
- i) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:7;
- j) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:7;
- 10 k) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:7;
- l) SEQ ID NO:7;
- m) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:12;
- n) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:12;
- o) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:12;
- 15 p) SEQ ID NO:12;
- q) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:17;
- r) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:17;
- s) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:17;
- t) SEQ ID NO:17;
- 20 u) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:20;
- v) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:20;
- w) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:20;
- x) SEQ ID NO:20;
- y) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:21;
- 25 z) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:21;
- aa) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:21;
- bb) SEQ ID NO:21;
- cc) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:23;
- dd) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:23;
- 30 ee) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:23;
- ff) SEQ ID NO:23;
- gg) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:25;
- hh) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:25;
- ii) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:25; y
- 35 jj) SEQ ID NO:25.

En lo sucesivo en el presente documento, el inhibidor de ActRII en el contexto de la invención se refiere al inhibidor de ActRII como se ha definido anteriormente.

- En ciertas realizaciones, los métodos en el contexto de la invención son para tratar un trastorno óseo adinámico en un sujeto, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento del trastorno óseo adinámico. Además, los métodos para tratar una forma de trastorno óseo adinámico de CKD-MBD en un sujeto comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesite tratamiento de la forma de trastorno óseo adinámico de CKD-MBD.
- 5 En ciertas realizaciones más específicas, el trastorno óseo adinámico se caracteriza por la ausencia de incorporación de tetraciclina en el hueso mineralizado.
- En ciertas realizaciones, los métodos en el contexto de la invención son para tratar una forma de CKD-MBD de bajo recambio óseo en un sujeto, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento de la forma con bajo recambio óseo de CKD-MBD. En una realización más específica, la forma de bajo recambio óseo de CKD-MBD es la osteomalacia.
- 10 En ciertas realizaciones, los métodos en el contexto de la invención son para tratar un trastorno óseo caracterizado por hiperfosfatemia en un sujeto, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento del trastorno óseo caracterizado por hiperfosfatemia.
- 15 En ciertas realizaciones, los métodos en el contexto de la invención son para tratar la calcificación aterosclerótica en un sujeto, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento de la calcificación aterosclerótica.
- En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad renal, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento de la enfermedad renal. En una realización más específica, la enfermedad renal es fibrosis renal.
- 20 En una realización específica, el método en el contexto de la invención es para tratar la calcificación extraesquelética en un sujeto, donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII al sujeto. En otra realización específica, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII al sujeto.
- 25 En realizaciones específicas, la calcificación extraesquelética tratada o prevenida en un sujeto por los métodos descritos en el presente documento es la calcificación vascular, es decir, la acumulación de sales de calcio en la vasculatura del sujeto, por ejemplo, la calcificación de las arterias del sujeto.
- En ciertas realizaciones, el inhibidor de ActRII que se puede usar con los métodos proporcionados en el presente documento es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:2; 90 % idéntica a la SEQ ID NO:3; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:3; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:3; 90 % idéntica a la SEQ ID NO:7; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:7; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:7; 90 % idéntica a la SEQ ID NO:12; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:12; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:12; 90 % idéntica a la SEQ ID NO:17; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:17; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:17;
- 35 90 % idéntica a la SEQ ID NO:20; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:20; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:20; 90 % idéntica a la SEQ ID NO:21; 95 % idéntica a la SEQ ID NO:21; 98 % idéntica a la SEQ ID NO:21; y SEQ ID NO:21. En una realización más específica, el inhibidor de ActRII es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7. En una realización más específica, el inhibidor de ActRII se administra por vía parenteral.
- 40 En una realización específica, el inhibidor de ActRII que puede usarse con los métodos proporcionados en el presente documento es un inhibidor de ActRIIA, donde el inhibidor de ActRIIA comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:2; b. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:2; c. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:2; d. SEQ ID NO:2; e. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:3; f. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:3; g. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:3; h. SEQ ID NO:3; m. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:7; n. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:7; o. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:7; p. SEQ ID NO:7; q. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:12; r. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:12; s. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:12; y t. SEQ ID NO:12. En una realización específica, el inhibidor de ActRIIA es un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.
- 45 En otra realización específica, el inhibidor de ActRII que puede usarse con los métodos proporcionados en el presente documento es un inhibidor de ActRIIB, donde el inhibidor de ActRIIB comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:17 o 23, b. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:17 o 23, c. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:17 o 23, d. SEQ ID NO:17 o 23, e. un polipéptido un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:20, 21 o 25, f. un polipéptido un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:20, 21 o 25, g. un polipéptido un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:20, 21 o 25 y h. SEQ ID NO:20, 21 o 25. En una realización específica, el inhibidor de ActRIIB es un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:23. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIB es un polipéptido que comprende o consiste

en la SEQ ID NO:25.

En otra realización específica, un inhibidor de ActRIIA y un inhibidor de ActRIIB pueden usarse en los métodos proporcionados en el presente documento (por ejemplo, puede usarse una composición que comprende un inhibidor de ActRIIA y un inhibidor de ActRIIB; o pueden administrarse, por separado, tanto un inhibidor de ActRIIA como un

5 inhibidor de ActRIIB a un sujeto que está siendo tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento), donde el inhibidor de ActRIIA comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:2; b. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:2; c. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:2; d. SEQ ID NO:2; e. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:3; f. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:3; g. un 10 polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:3; h. SEQ ID NO:3; m. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:7; n. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:7; o. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:7; p. SEQ ID NO:7; q. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:12; r. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:12; s. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:12; y t. SEQ ID NO: 12; y donde el inhibidor de ActRIIB comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del 15 grupo que consiste en: a. un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:17 o 23, b. un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:17 o 23, c. un polipéptido al menos un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:17 o 23, d. SEQ ID NO:17 o 23, e. un polipéptido un 90 % idéntico a la SEQ ID NO:20, 21 o 25, f. un polipéptido un 95 % idéntico a la SEQ ID NO:20, 21 o 25, g. un polipéptido un 98 % idéntico a la SEQ ID NO:20, 21 o 25, y h. SEQ ID NO:20, 21 o 25. En una realización específica, el inhibidor de ActRIIA es un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:7 y el inhibidor de ActRIIB es un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:23. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIA es un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:7 y el inhibidor de ActRIIB es un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:25.

20 En ciertas realizaciones, el sujeto que se va a tratar con los métodos proporcionados en el presente documento tiene menos de 18 años de edad. En ciertas realizaciones, el sujeto que se va a tratar con los métodos proporcionados en el presente documento tiene enfermedad renal crónica en etapa terminal. En ciertas realizaciones, el sujeto que se va a tratar con los métodos proporcionados en el presente documento se somete a diálisis. En ciertas realizaciones, el método puede aumentar la altura del sujeto.

25 En ciertas realizaciones, los métodos para tratar o prevenir la hiperfosfatemia, el hiperparatiroidismo secundario (debido al aumento de fósforo), la calcificación extraesquelética, por ejemplo, la calcificación vascular y el trastorno óseo adinámico en un sujeto, comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita el tratamiento de la hiperfosfatemia, el hiperparatiroidismo secundario (debido al aumento de fósforo), la calcificación extraesquelética, por ejemplo, la calcificación vascular y hueso adinámico.

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1: Peso corporal de un ratón tras nefrectomía parcial.

30 Figura 2: Cambios en la BMD mediante DEXA tras nefrectomía parcial en ratones.

Figura 3: Cambios en el hematocrito del equivalente murino de la SEQ ID NO 7 («mActRIIA-Fc») tras nefrectomía parcial en ratones.

Figura 4: Imagen 3D de micro-CT de huesos representativos tras nefrectomía parcial en ratones.

Figura 5: el tratamiento con mActRIIA-Fc aumenta el hematocrito.

40 Figura 6: mActRIIA-Fc la densidad mineral ósea.

Figura 7: Tomografías micro-CT representativas de fémures.

Figura 8: mActRIIA-Fc aumenta el espesor cortical de la diáfisis media del fémur.

Figura 9: mActRIIA-Fc aumenta el volumen óseo trabecular.

Figura 10: mActRIIA-Fc aumenta el espesor trabecular en el fémur distal.

45 Figura 11: mActRIIA-Fc provoca una reducción de los niveles de calcio aórtico en un modelo de ratón con CKD.

5. Descripción detallada

5.1 INFORMACIÓN GENERAL

En el presente documento se proporciona, en un aspecto, un inhibidor de ActRII para su uso en un método de tratamiento de trastornos minerales y óseos asociados a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD) donde el método comprende la administración de un inhibidor de ActRII a un paciente que necesita tratamiento. El inhibidor de ActRII 50 puede ser un inhibidor de ActRIIA y/o ActRIIB.

- Los CKD-MBD se pueden diagnosticar como un trastorno sistémico del metabolismo mineral y óseo debido a la enfermedad renal crónica y se pueden manifestar mediante una o una combinación de (1) anomalías de calcio; fósforo, producto de calcio x fósforo; fosfatases alcalinas (totales o específicas del hueso); bicarbonato; hormona paratiroidea («PTH»); PTH 1-84, relación PTH 1-84/PTH 7-84; osteocalcina; osteoprotegerina; isoforma 5b de la fosfatasa ácida tartrato-resistente («TRAP-5b»); piridinolina y desoxipiridinolina; péptidos de extensión aminoterminal del procolágeno tipo 1; enlaces cruzados en C-terminal; enlaces cruzados de colágeno en C-terminal; factor de crecimiento fibroblástico 23 («FGF23»); fetulina-A; o metabolismo de la vitamina D; (2) anomalías del recambio, la mineralización, el volumen, el crecimiento lineal o la resistencia óseos y (3) calcificación vascular o de otros tejidos blandos. Véase Nickolas, 2008, Kidney International 74:721-731; and Moe y col., 2006, Kidney International 69:1945-1953. Se pueden encontrar directrices para el diagnóstico de los CKD-MBD, p. ej., en KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, In: Kidney Int Suppl. (2009) 76 (Suppl 113):S1-130.
- En ciertas realizaciones del presente documento, se proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en métodos de formas de bajo recambio óseo de los CKD-MBD donde el método comprende la administración de un inhibidor de ActRII a un paciente que necesita tratamiento. En ciertas realizaciones del presente documento, se proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en métodos de tratamiento de los CKD-MBD caracterizados por hiperfosfatemia y/o hipercalcemia. En ciertas realizaciones del presente documento, se proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en métodos de tratamiento de los CKD-MBD caracterizados por calcificación extraesquelética tales como, pero no limitados a, la calcificación aterosclerótica.
- En ciertas realizaciones del presente documento, se proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en métodos de tratamiento de los CKD-MBD, donde la enfermedad renal crónica ha alcanzado una etapa 3, etapa 4, etapa 5, o etapa 5D. En una realización específica, la enfermedad renal es una enfermedad renal en etapa terminal. En ciertas realizaciones del presente documento, los métodos de tratamiento de los CKD-MBD están caracterizados por una velocidad de filtración glomerular inferior a 60 ml/min/1,73 m² en adultos o inferior a 89 ml/min/1,73 m² en pacientes pediátricos. Véase, Moe y col., 2006, Kidney International 69:1945-1953. En ciertas realizaciones del presente documento, los métodos de tratamiento en adultos de los CKD-MBD están caracterizados por una velocidad de filtración glomerular inferior a 50 ml/min/1,73 m², 40 ml/min/1,73 m², 30 ml/min/1,73 m², 20 ml/min/1,73 m² o inferior a 10 ml/min/1,73 m². En ciertas realizaciones del presente documento, los métodos de tratamiento en pacientes pediátricos de los CKD-MBD están caracterizados por una velocidad de filtración glomerular inferior a 80 ml/min/1,73 m², 70 ml/min/1,73 m², 60 ml/min/1,73 m², 50 ml/min/1,73 m², 40 ml/min/1,73 m², 30 ml/min/1,73 m², 20 ml/min/1,73 m² o inferior a 10 ml/min/1,73 m².
- Sin querer limitarnos a la teoría, una velocidad de filtración glomerular inferior a 60 ml/min/1,73m² en pacientes adultos e inferior a 89 ml/min/1,73 m² en pacientes pediátricos deriva en anomalías detectables de los niveles de calcio, los niveles de fósforo, los niveles de PTH y el metabolismo de la vitamina D; y los niveles anómalos de estos marcadores derivan en enfermedad ósea.
- En ciertas realizaciones, una patología ósea está asociada a la enfermedad renal crónica, es decir, un CKD-MBD. Véase Moe y col., 2006, Kidney International 69:1945-1953. En ciertas realizaciones, el CKD-MBD es un CKD-MBD de bajo recambio óseo. Los CKD-MBD por recambio bajo se pueden diagnosticar mediante las características histológicas expuestas en la Tabla 1 que se muestra a continuación. Véase National Kidney Foundation, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines en el sitio web de la National Kidney Foundation.

Tabla 1 Características histológicas de los CKD-MBD de bajo recambio

Característica	Adinámico	Osteomalacia
Formación de hueso		
Volumen óseo trabecular	Normal, bajo	Variable
		Bajo, normal o alto
Volumen de osteoide	Normal, bajo	Alto-muy alto
Espesor del ribete de osteoide	Normal, bajo	Alto-muy alto
Número de osteoblastos	Bajo	Bajo
Velocidad de formación de hueso	Baja-muy baja	Baja-muy baja
Retraso de la mineralización	Normal	Prolongado
Resorción ósea		

Perímetro óseo erosionado	Normal, bajo	Variable
		Con frecuencia bajo, puede ser alto
Número de osteoclastos	Bajo	Bajo, puede ser normal o alto
Fibrosis medular	Ausente	Ausente

En una realización específica, el método de tratamiento de calcificación extraesquelética en un sujeto comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII al sujeto. Específicamente, un método de prevención de calcificación extraesquelética en un sujeto, donde dicho método comprende la

5 administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII al sujeto. En realizaciones específicas, la calcificación extraesquelética tratada o prevenida en un sujeto mediante los métodos descritos en el presente documento es calcificación vascular, es decir, la acumulación de sales de calcio en la vasculatura del sujeto, por ejemplo, calcificación de las arterias del sujeto.

10 Los métodos de tratamiento o prevención de la calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, se llevan a cabo en un sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular (es decir, se administra al sujeto en riesgo un inhibidor de ActRII de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento). En una realización específica, el sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene hipercolesterolemia. En otra realización específica, el sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene hipertensión. En otra realización específica, el

15 sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene diabetes. En otra realización específica, el sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene una enfermedad renal (por ejemplo, una enfermedad renal en etapa terminal). En otra realización específica, el sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene enfermedad renal crónica. En otra realización específica, el sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene un aumento del estrés oxidativo, por ejemplo, un desequilibrio entre producción de

20 oxidantes y actividad antioxidante en la vasculatura. En otra realización específica, el sujeto con riesgo de sufrir calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene deficiencia de inhibidor de la calcificación (por ejemplo, una deficiencia de una o más de entre fetuina-A, proteína Gla de matriz (MGP) y osteoprotegerina (OPG)).

25 En ciertas realizaciones, los sujetos que sufren calcificación vascular tratados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tienen calcificación de la media (también conocida como esclerosis de Mönckeberg o calcinosis de la media). La calcificación de la media se caracteriza por depósitos minerales difusos en la túnica media de las arterias. En una realización específica, los sujetos que sufren calcificación de la media son ancianos. En una realización específica, los sujetos que sufren calcificación de la media tienen un trastorno que provoca la calcificación de la media, por ejemplo, diabetes o una enfermedad renal (por ejemplo, CKD).

30 En ciertas realizaciones, los sujetos que sufren calcificación vascular tratados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tienen calcificación de la íntima. La calcificación de la íntima se asocia a la aterosclerosis y progresiva a medida que progresan las placas ateroscleróticas.

35 En ciertas realizaciones, un paciente que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, tiene mayores niveles de FGF23, una hormona producida por los osteocitos en respuesta a la reducción de la carga mecánica, menor formación de hueso y exceso de fósforo en el reservorio intercambiable (véase, p. ej., el documento Hruska and Mathew, 2011, Advances in Chronic Kidney Disease 18(2):98-104), relativo a los niveles de FGF23 en sujetos que no sufren, ni tienen riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular. Se pueden detectar los niveles de FGF23 usando métodos conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, usando muestras de los sujetos, p. ej., sangre o suero. En una

40 realización específica, el nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, es de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más del 50 %, superior al nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que no sufre, ni tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular. En otra realización específica, el nivel de

45 FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, es de aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 50-75 % o 75-100 %, superior al nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que no sufre, ni tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular.

50 En ciertas realizaciones, los niveles de FGF23 en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, se pueden usar para monitorizar la efectividad de un método descrito en el presente documento, p. ej., un método de tratamiento de una forma de CKD-BMD y/o un método de tratamiento de la calcificación extraesquelética (p. ej., calcificación vascular), donde tales métodos

comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII descrito en el presente documento. En una realización específica, un sujeto tratado de acuerdo con uno o más de los métodos descritos en el presente documento tiene un nivel de FGF23 (p. ej., tal y como se detecta en el suero del sujeto) menor que el nivel de FGF23 detectado en el sujeto antes de ser tratado con un método descrito en el presente documento.

- 5 En otra realización específica, el nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, tratado con un método descrito en el presente documento se ha reducido en aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más del 50 % en comparación con el nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) detectado en el sujeto antes del tratamiento con un método descrito en el presente documento. En otra
- 10 realización específica, el nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, se ha reducido en aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 50-75 % o 75-100 % en comparación con el nivel de FGF23 (p. ej., el nivel detectable en el suero) detectado en el sujeto antes del tratamiento con un método descrito en el presente documento.
- 15 En una realización específica, el método de tratamiento de una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular, comprende: (i) administración de un inhibidor de ActRII a un individuo que padece una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular; (ii) determinación de una cantidad de FGF23 en una muestra de tejido (p. ej., suero) de dicho individuo después de la administración del inhibidor de ActRII y (iii) si la cantidad de FGF23 en dicha muestra de tejido se ha reducido en menos de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 %, o en aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 % en comparación con la cantidad de FGF23 determinada en una muestra del mismo tipo de tejido de dicho individuo (p. ej., una muestra diferente de suero del mismo individuo) antes de la administración del inhibidor de ActRII, repetición de la administración del inhibidor de ActRII. En ciertas realizaciones, si la cantidad de FGF23 no se reduce después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la dosis de inhibidor de ActRII administrada. En ciertas realizaciones, si la cantidad de FGF23 no se reduce después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la frecuencia de administración del inhibidor de ActRII administrado.
- 20 25

En ciertas realizaciones, un paciente que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, tiene mayores niveles de esclerostina, una proteína que presenta mayores niveles en sujetos que sufren, o tienen riesgo de sufrir, CKD-MBD (véase, p. ej., Graciolli y col., 2010, J Am Soc Nephrol 21:774A), relativo a los niveles de esclerostina en sujetos que no sufren, ni tienen riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular. Se pueden detectar los niveles de esclerostina usando métodos conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, usando muestras de los sujetos, p. ej., sangre o suero. En una realización específica, el nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o con riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, es de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o superior al 50 % superior al nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que no sufre, ni tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular. En otra realización específica, el nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o con riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, es de aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 50-75 % o 75-100 % superior al nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que no sufre, ni tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, por ejemplo, calcificación vascular.

En ciertas realizaciones, los niveles de esclerostina en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, se pueden usar para monitorizar la efectividad de un método descrito en el presente documento, p. ej., un método de tratamiento de una forma de CKD-MBD y/o un método de tratamiento de la calcificación extraesquelética (por ejemplo, calcificación vascular), donde tales métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII descrito en el presente documento. En una realización específica, un sujeto tratado de acuerdo con uno o más de los métodos descritos en el presente documento tiene un nivel de esclerostina (p. ej., tal y como se detecta en el suero del sujeto) menor que el nivel de esclerostina detectado en el sujeto antes de ser tratado con un método descrito en el presente documento. En otra realización específica, el nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, tratado con un método descrito en el presente documento se ha reducido en aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más del 50 % en comparación con el nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) detectado en el sujeto antes del tratamiento con un método descrito en el presente documento. En otra realización específica, el nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) en un sujeto que sufre, o tiene riesgo de sufrir, una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, se ha reducido en aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 50-75 % o 75-100 % en comparación con el nivel de esclerostina (p. ej., el nivel detectable en el suero) detectado en el sujeto antes del tratamiento con un método descrito en el presente documento.

En una realización específica, el método de tratamiento de una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, comprende: (i) administración de un inhibidor de ActRII a un individuo que padece una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular; (ii) determinación de una cantidad

- de esclerostina en una muestra de tejido (p. ej., suero) de dicho individuo después de la administración del inhibidor de ActRII y (iii) si la cantidad de esclerostina en dicha muestra de tejido se ha reducido en menos de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 %, o en aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 % en comparación con la cantidad de esclerostina determinada en una muestra del mismo tejido de dicho individuo (p. ej., una muestra diferente de suero del mismo individuo) antes de la administración del inhibidor de ActRII, repetición de la administración del inhibidor de ActRII. En ciertas realizaciones, si la cantidad de esclerostina no se reduce después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la dosis del inhibidor de ActRII administrada. En ciertas realizaciones, si la cantidad de esclerostina no se reduce después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la frecuencia de administración de inhibidor de ActRII administrado.
- 10 En ciertas realizaciones, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 18 años de edad. En una realización específica, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 13 años de edad. En otra realización específica, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con 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 de edad. En otra realización específica, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene de 1-3 años de edad, 3-5 años de edad, 5-7 años de edad, 7-9 años de edad, 9-11 años de edad, 11-13 años de edad, 13-15 años de edad, 15-20 años de edad, 20-25 años de edad, 25-30 años de edad o más de 30 años de edad. En otra realización específica, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene de 30-35 años de edad, 35-40 años de edad, 40-45 años de edad, 45-50 años de edad, 50-55 años de edad, 55-60 años de edad o más de 60 años de edad. En otra realización específica, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene de 60-65 años de edad, 65-70 años de edad, 70-75 años de edad, 75-80 años de edad o más de 80 años de edad.
- 15 En ciertas realizaciones, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene una enfermedad renal en etapa terminal. En ciertas realizaciones, el sujeto que sufre calcificación vascular tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se somete a diálisis.
- 20 En ciertas realizaciones, la efectividad del tratamiento o la prevención de la calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular, se evalúa usando uno o más ensayos conocidos por los expertos en la materia. Los ensayos ejemplares se describen en la Sección 5.3(a)(iv). De acuerdo con tales realizaciones, un experto en la materia entenderá que al sujeto que está siendo tratado con un inhibidor de ActRII tal y como se describe en el presente documento se le puede ajustar el régimen de tratamiento en función del resultado de los ensayos. Por ejemplo, a un sujeto que está siendo tratado mediante un método descrito en el presente documento y muestra aumento de los niveles de calcio, p. ej., calcio vascular (p. ej., calcio arterial), se le puede administrar una dosis mayor de inhibidor de ActRII o se le puede administrar un inhibidor de ActRII más frecuentemente (es decir, el tiempo entre administraciones de dosis se puede reducir). Por el contrario, a un sujeto que está siendo tratado mediante un método descrito en el presente documento y muestra reducción de los niveles de calcio, p. ej., calcio vascular (p. ej., calcio arterial), se le puede administrar una dosis menor de inhibidor de ActRII o se le puede administrar un inhibidor de ActRII menos frecuentemente (es decir, el tiempo entre administraciones de dosis se puede aumentar).
- 25 En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento derivan en la mejora de los síntomas de uno o más de los siguientes: hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario (debido al aumento de fósforo) y calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular. Cualquier método conocido por el experto en la materia para determinar el grado de estos síntomas se puede usar con los métodos proporcionados en el presente documento. En realizaciones específicas, los métodos descritos en el presente documento derivan en la mejora de uno o más síntomas de la calcificación vascular. Los síntomas ejemplares incluyen, sin limitación, aumentos de los niveles de calcio vascular (p. ej., arterial), aumento de la apoptosis de las células del músculo liso vascular, pérdida de elasticidad arterial, un aumento de la PWV (velocidad de la onda de pulso arterial), desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, reducción de la perfusión de la arteria coronaria e isquemia miocárdica.
- 30 En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento derivan en una reducción de los niveles de calcio vascular, p. ej., calcio arterial, en un sujeto de al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento derivan en una reducción de los niveles de calcio vascular, p. ej., calcio arterial, en un sujeto del 5-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 % o 45-50 %.
- 35 En una realización específica, el método de reducción de los niveles de calcio vascular en un sujeto comprende: (i) administración de un inhibidor de ActRII a un sujeto que necesita una reducción de los niveles de calcio vascular (p. ej., un sujeto que padece una forma de CKD-MBD y/o calcificación extraesquelética, p. ej., calcificación vascular); (ii) determinación de una cantidad de calcio vascular en una muestra de tejido (p. ej., suero) de dicho sujeto después de la administración del inhibidor de ActRII y (iii) si la cantidad de calcio vascular en dicha muestra de tejido se ha reducido menos de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 %, o en aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 % en comparación con la cantidad de calcio vascular determinada en una muestra del mismo tejido de dicho sujeto (p. ej., una muestra diferente de suero del mismo individuo) antes de la administración del inhibidor de ActRII, repetición de la administración del inhibidor de ActRII. En ciertas realizaciones, si la cantidad de calcio vascular no se reduce

después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la dosis de inhibidor de ActRII administrada. En ciertas realizaciones, si la cantidad de calcio vascular no se reduce después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la frecuencia de administración del inhibidor de ActRII administrado.

5 En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento derivan en un descenso de la progresión del puntaje de Agatston de un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar calcificación vascular. En una realización específica, los métodos descritos en el presente documento permiten un descenso del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o superior al 30 % del puntaje de Agatston de un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar calcificación vascular en comparación con el puntaje de Agatston del sujeto antes de la administración de un inhibidor de ActRII de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento (véase, p. ej., la Sección 5.3(a)(iv)). En una realización 10 específica, los métodos descritos en el presente documento permiten un descenso del 5-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 % o 45-50 % del puntaje de Agatston de un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar calcificación vascular en comparación con el puntaje de Agatston del sujeto antes de la administración de un inhibidor de ActRII de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento (véase, p. ej., la Sección 5.3(a)(iv)).

15 10 En otra realización específica, los métodos descritos en el presente documento permiten un descenso de los niveles de calcio en la vasculatura del sujeto, p. ej., un descenso de los niveles de calcio en una o más arterias del sujeto, p. ej., un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar calcificación vascular. En otra realización específica, los métodos descritos en el presente documento permiten un descenso de los niveles de fósforo en la vasculatura del sujeto, p. ej., un descenso de los niveles de fósforo en una o más arterias del sujeto, p. ej., un sujeto que padece o 20 tiene riesgo de desarrollar calcificación vascular.

25 En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento son enfermedades óseas de bajo recambio. El recambio óseo bajo se puede diagnosticar usando las pruebas expuestas en la Sección 5.3(a) que se muestra más adelante. Los marcadores bioquímicos del recambio óseo incluyen: enlaces cruzados de colágeno (telopéptido N o telopéptido C) en suero u orina, fosfatasa alcalina específica del hueso, osteocalcina sérica y/o propéptido de colágeno tipo 1, 25-hidroxivitamina D y hormona paratiroides (*«PTH»*). En una realización específica, la enfermedad ósea de bajo recambio es enfermedad ósea adinámica. En ciertas realizaciones, un paciente que se va a tratar con los métodos descritos en el presente documento tiene una reducción del recambio óseo de al menos un 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o del 100 %. En ciertas realizaciones, un paciente que se va a tratar con los métodos descritos en el presente documento tiene una reducción del recambio óseo de entre el 10 % y el 25 %, 20 % y 35 %, 30 % y 45 %, 40 % y 55 %, 50 % y 65 %, 60 % y 75 %, 70 % y 85 %, 80 % y 95 %, 90 % y 100 %. En ciertas realizaciones, la reducción del recambio óseo se compara con los datos históricos del mismo paciente. En otras realizaciones, la reducción del recambio óseo 30 se compara con el recambio óseo promedio de una población sin enfermedades óseas. La población sin enfermedades óseas puede ser de la misma edad y/o el mismo sexo que el paciente.

35 En una realización específica, el método de tratamiento de una enfermedad ósea de bajo recambio, p. ej., enfermedad ósea adinámica, comprende: (i) administración de un inhibidor de ActRII a un sujeto que tiene una enfermedad ósea de bajo recambio; (ii) determinación del nivel de recambio óseo en dicho sujeto después de la administración del inhibidor de ActRII (p. ej., usando una o más de las pruebas expuestas en la Sección 5.3(a) que se muestra más adelante y/o midiendo uno o más de los marcadores bioquímicos de recambio óseo) y (iii) si el nivel de recambio óseo en el sujeto ha disminuido menos de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 %, o aproximadamente el 5-10 %, 10-20 %, 20-30 % en comparación con el nivel de recambio óseo del sujeto antes de la administración del inhibidor de ActRII, repetición de la administración del inhibidor de ActRII. En ciertas realizaciones, si el nivel de recambio óseo 40 no ha disminuido después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la dosis del inhibidor de ActRII administrada. En ciertas realizaciones, si el nivel de recambio óseo no ha disminuido después de la administración del inhibidor de ActRII, se puede aumentar la frecuencia de administración del inhibidor de ActRII administrado.

5.2 INHIBIDORES DE ACTRII

50 (a) INHIBIDORES DE ACTRIIA

Tal y como se usa en el presente documento, el término *«ActRIIA»* se refiere a una familia de proteínas que son receptores tipo IIA de activina (ActRIIA) de cualquier especie y variantes procedentes de tales proteínas ActRIIA mediante mutagénesis u otra modificación. Se entiende que la referencia a ActRIIA en el presente documento es una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActRIIA son generalmente 55 proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con prevista actividad serina/treonina quinasa.

Los inhibidores de ActRIIA para uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos ActRIIA solubles de unión a activina; anticuerpos que se unen a activina (concretamente a las subunidades A o B de activina, también conocidas como β A o β B) y alteran la unión a ActRIIA; anticuerpos que se

unen a ActRIIA y alteran la unión a activina; proteínas que no son anticuerpos seleccionadas para unión a activina o ActRIIA. (véanse, p.ej., los documentos WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US 2003/0133939 y US 2005/0238646, para consultar ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y selección de las mismas) y péptidos aleatorios seleccionados para unión a activina o ActRIIA que se pueden conjugar a un dominio Fc.

En ciertas realizaciones, dos o más proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina o ActRIIA, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión tipo I (p. ej., un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (p. ej., un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, se pueden enlazar para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe al receptor ActRIIA y, por tanto, se pueden usar en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, los antagonistas del eje de señalización Activina-ActRIIA que inhiben al receptor ActRIIA, entre los que se incluyen aptámeros de ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y otros agentes, se usan en las composiciones y los métodos del presente documento.

(i) Inhibidores de ActRIIA que comprenden polipéptidos ActRIIA

El término «polipéptido ActRIIA» incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de un miembro de la familia ActRIIA presente de forma natural, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retiene una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIA incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIA conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIA y, opcionalmente, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIA puede unirse a una proteína ActRIIA y/o activina e inhibir su función. Un polipéptido ActRIIB se puede seleccionar por su capacidad de promover el crecimiento de hueso y la mineralización ósea. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIA incluyen el polipéptido precursor del receptor ActRIIA humano (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos ActRIIA humanos solubles (p.ej., las SEQ ID NO: 2, 3, 7 y 12). Con respecto al polipéptido precursor del receptor ActRIIA cuya secuencia de aminoácidos está representada en la SEQ ID NO: 1, el péptido señal del polipéptido precursor del ActRIIA humano está localizado en las posiciones de aminoácidos 1 a 20; el dominio extracelular está localizado en las posiciones de aminoácidos 21 a 135 y los sitios de N-glicosilación del polipéptido precursor del ActRIIA humano (SEQ ID NO: 1) están localizados en las posiciones de aminoácidos 43 y 56 de la SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor del ActRIIB humano de SEQ ID NO: 1 se desvela como SEQ ID NO: 4 (nucleótidos 164-1705 de la entrada NM_001616 del Genbank). La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido ActRIIA humano soluble de SEQ ID NO: 2 se desvela como SEQ ID NO: 5. Véase la Tabla 6 para ver una descripción de las secuencias.

En realizaciones específicas, los polipéptidos ActRIIA usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son polipéptidos ActRIIA solubles. Un dominio extracelular de una proteína ActRIIA se puede unir a activina y es generalmente soluble, por lo tanto, se puede denominar un polipéptido ActRIIA de unión a activina soluble. Por tanto, tal y como se usa en el presente documento, el término «polipéptido ActRIIA soluble» generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIA, incluyendo cualquier dominio extracelular de una proteína ActRIIA presente de forma natural, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Los polipéptidos ActRIIA solubles se pueden unir a activina; sin embargo, la proteína ActRIIA de tipo salvaje no exhibe selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. Se puede aportar especificidad añadida a las proteínas ActRIIA nativas o alteradas mediante acoplamiento con un segundo agente de unión a activina selectivo. Ejemplos de polipéptidos ActRIIA de unión a activina solubles se ilustran en las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 y 13. Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIA de unión a activina solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIA, por ejemplo, la secuencia líder de la melitina de abeja melífera (SEQ ID NO: 8), la secuencia líder del activador del plasminógeno tisular (TPA) (SEQ ID NO: 9) o la secuencia líder del ActRIIA nativo (SEQ ID NO: 10). El polipéptido ActRIIA-hFc ilustrado en la SEQ ID NO: 13 usa una secuencia líder de TPA.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento comprenden una proteína de fusión/conjugada que comprende un dominio de unión a activina de ActRIIA conectado a una porción Fc de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a activina está conectado a una porción Fc de un anticuerpo a través de un conector, por ejemplo, un conector peptídico. Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p. ej., una mutación Asp-265) tiene menor capacidad de unión al receptor Fcγ que un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asn-434) tiene mayor capacidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) de estructura similar a una molécula MHC clase I que un dominio Fc de tipo salvaje. Las proteínas de fusión ejemplares que comprenden un dominio extracelular de ActRIIA soluble fusionado a un dominio Fc se exponen en las SEQ ID NO: 7, 12 y 13.

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

documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIA, o una porción del mismo, conectado a una porción Fc de un anticuerpo, donde dicho inhibidor de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 7, 12 y 13.

- 5 En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIA. El truncamiento puede estar en el extremo C-terminal y/o en el extremo N-terminal del polipéptido ActRIIA. En ciertas realizaciones, el truncamiento 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 en comparación con el dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertas 10 realizaciones, el truncamiento 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 N-terminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIA maduro. En ciertas 15 realizaciones, el truncamiento 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 C-terminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIA maduro. Por ejemplo, las formas truncadas de ActRIIA incluyen polipéptidos con 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, donde las posiciones de los aminoácidos se refieren a las 15 posiciones de los aminoácidos en la SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y los 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 ActRIIA usados en las composiciones y los métodos descritos en el 20 presente documento comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIA que también lleva una sustitución de aminoácido.

En una realización específica, el inhibidor de ActRIIA que se va a usar en las composiciones y los 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 ActRIIA que se va a usar en las composiciones y los 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 ActRIIA que se va a usar en las composiciones y los 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, donde el dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano posee una o más sustituciones de aminoácidos.

30 Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIA, por ejemplo, mediante cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del correspondiente fragmento del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIA. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como la síntesis química en fase sólida mediante los métodos Fmoc o t-Boc de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o mediante síntesis química) y ensayar para identificar los fragmentos peptídicos que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIA o de la señalización mediada por activina.

Además, se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRIIA, por ejemplo, mediante cribado de bibliotecas de polipéptidos modificados producidos recombinantemente a partir de los correspondientes ácidos nucleicos mutagenizados que codifican un polipéptido ActRIIA. Las variantes se pueden producir y ensayar para 40 identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIA o de la señalización mediada por activina. En ciertas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las 45 SEQ ID NO: 2 o 3.

Se pueden generar variantes funcionales, por ejemplo, mediante modificación de la estructura de un polipéptido ActRIIA para propósitos tales como la mejora de la eficacia terapéutica o la estabilidad (p. ej., la vida útil de almacenamiento ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Cuando se seleccionan tales polipéptidos ActRIIA modificados para retener la unión a activina, se pueden considerar equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIA presentes en la naturaleza. También se pueden producir polipéptidos ActRIIA, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, cabe esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (p. ej., mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras 50 son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIA deriva en un homólogo funcional mediante evaluación de la capacidad de la variante del polipéptido ActRIIA para producir una respuesta en las células similar a la del polipéptido ActRIIA de tipo salvaje.

60 En ciertas realizaciones, el inhibidor de ActRIIA que se va a usar en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento puede comprender un polipéptido ActRIIA que tiene una o más mutaciones específicas que

pueden alterar la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones pueden introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como los sitios de O-glicosilación o los sitios de N-glicosilación. Los sitios de reconocimiento de la glicosilación por enlace a asparagina generalmente comprenden una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (donde «X» es cualquier aminoácido), que es reconocida específicamente por las enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también se puede hacer por adición de, o sustitución de, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIA de tipo salvaje (para sitios de O-glicosilación). Una variedad de sustituciones o delecciones en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera y tercera de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) deriva en la no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en un polipéptido ActRIIA es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRIIA. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el(s) azúcar(es) se pueden fijar a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La eliminación de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIA se puede conseguir químicamente y/o enzimáticamente. La deglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIA al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento deriva en la escisión de la mayoría de los azúcares, o todos ellos, excepto el azúcar de conexión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando la secuencia de aminoácidos intacta. La deglicosilación química se describe con más detalle en Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y en Edge y col. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos carbohidrato en polipéptidos ActRIIA se puede conseguir mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura y col. (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 todas las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIA para uso en humanos se pueden expresar en una línea celular de mamífero que permita una glicosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, pero se prevé que otros sistemas de expresión, tales como otras líneas celulares de expresión en mamíferos, líneas celulares de levaduras con enzimas de glicosilación modificadas y células de insectos, también pueden ser útiles.

En el presente documento se desvelan métodos de generación de mutantes, en concreto conjuntos de mutantes combinatoriales de un polipéptido ActRIIA y mutantes de truncamiento; los pools de mutantes combinatoriales son especialmente útiles para la identificación de secuencias de variantes funcionales. El propósito del cribado de tales bibliotecas combinatoriales puede ser el de generar, por ejemplo, variantes del polipéptido ActRIIA que puedan actuar como agonistas o antagonistas o, como alternativa, que posean actividades novedosas en conjunto. A continuación, se describe una variedad de ensayos de cribado, y tales ensayos se pueden usar para evaluar variantes. Por ejemplo, se puede cribar una variante de polipéptido ActRIIA para que tenga capacidad de unión a un ligando de ActRIIA con el fin de evitar la unión de un ligando de ActRIIA a un polipéptido ActRIIA o para que interfiera con la señalización provocada por un ligando de ActRIIA.

Se pueden generar variantes derivadas combinatorialmente que tengan una potencia selectiva, o generalmente mayor, que un polipéptido ActRIIA presente de forma natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan semividas intracelulares drásticamente diferentes de las del correspondiente polipéptido ActRIIA de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que derivan en la destrucción o inactivación de un polipéptido ActRIIA nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIA mediante modulación de la semivida de los polipéptidos ActRIIA. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido ActRIIA en el paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatorial mediante una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que incluyen, todos ellos, al menos una porción de secuencias de polipéptidos ActRIIA potenciales. Por ejemplo, se puede ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos a secuencias de genes de tal forma que el conjunto degenerado de secuencias de nucleótidos de polipéptido ActRIIA potencial se pueda expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para expresión en fago).

La biblioteca de homólogos potenciales se puede generar de muchas formas a partir de una secuencia de oligonucleótido degenerada. La síntesis química de una secuencia de gen degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automatizado y, a continuación, se pueden ligar los genes sintéticos a un vector de expresión adecuado. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura y col., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura y col., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura y col., (1984) Science 198:1056; Ike y col., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott y col., (1990) Science 249:386-390; Roberts y col., (1992) PNAS

USA 89:2429-2433; Devlin y col., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla y col., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las patentes US5223409, US5198346 y US5096815).

Como alternativa, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatorial. Por ejemplo, se pueden generar y aislar variantes de polipéptido ActRIIA a partir de una biblioteca mediante cribado usando, por ejemplo, mutagénesis dirigida por barrido de alanina y similares (Ruf y col., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang y col., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint y col., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg y col., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima y col., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman y col., (1991) Biochemistry 30:10832-10838 y Cunningham y col., (1989) Science 244:1081-1085); mediante mutagénesis dirigida por barrido de conector (Gustin y col., (1993) Virology 193:653-660; Brown y col., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight y col., (1982) Science 232:316); mediante mutagénesis por saturación (Meyers y col., (1986) Science 232:613); mediante mutagénesis dirigida por PCR (Leung y col., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller y col., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.y Greener y col., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). La mutagénesis dirigida por barrido de conector, especialmente en un entorno combinatorial, es un método atractivo para la identificación de formas truncadas (bioactivas) de polipéptido ActRIIA.

En la técnica se conoce una amplia gama de técnicas para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales fabricadas mediante mutaciones y truncamientos puntuales y, por ende, para el cribado de genotecas de ADNc para productos génicos que tienen una determinada propiedad. Generalmente, tales técnicas serán adaptables para el cribado rápido de genotecas generadas mediante la mutagénesis combinatorial de polipéptidos ActRIIA. Habitualmente, las bibliotecas generalmente usadas para el cribado de genotecas grandes comprenden la clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatoriales en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente sencillo del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender modificaciones postraduccionales además de las presentes de forma natural en los polipéptidos ActRIIA. Tales modificaciones pueden incluir, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIA modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIA se pueden ensayar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Cuando se produce un polipéptido ActRIIA en las células mediante escisión de una forma incipiente del polipéptido ActRIIA, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para corregir el plegamiento y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIA.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y las composiciones descritas 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 tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante (Fc) de una cadena pesada de inmunoglobulina, proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión de tal forma que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son especialmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para la purificación por afinidad, se usan matrices para cromatografía de afinidad pertinentes, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y con níquel o cobalto. Muchas de tales matrices se comercializan en forma de «kit», tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress. TM (Qiagen), útil con parejas de fusión (HIS6). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión de tal modo que facilite la detección de los polipéptidos ActRIIA. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como «epítopos marcadores», que normalmente son secuencias peptídicas cortas para las que se dispone de un anticuerpo específico. Entre los epítopos marcadores bien conocidos para los que es fácil disponer de anticuerpos monoclonales específicos se incluyen el epítopo FLAG, el virus de la gripe, la hemaglutinina (HA) y los marcadores c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión para proteasas, tal como para el factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por consiguiente, libere de ahí las proteínas recombinantes. A continuación, las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión mediante 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 entiende cualquier cosa que aumenta la semivida en suero, independientemente de si lo hace mediante reducción de la destrucción, reducción de la eliminación por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren las propiedades farmacocinéticas deseadas a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Entre otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar se incluyen los dominios multimerizantes (p. ej., dimerizantes, tetramerizantes) y los

dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento óseo o el crecimiento muscular, según convenga).

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden adoptar cualquier disposición que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIA se puede colocar en posición C-terminal respecto a un dominio heterólogo o, como alternativa, un dominio heterólogo se puede colocar en posición C-terminal respecto a un polipéptido ActRIIA. El dominio del polipéptido ActRIIA y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en las posiciones C- o N-terminal de ambos dominios o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden contener una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIA. Por ejemplo, tales modificaciones pueden mejorar la semivida in vivo de los polipéptidos ActRIIA, mejorar la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIA o reducir la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIA. Tales modificaciones estabilizadoras 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 glicosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIA) y modificaciones de restos carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos carbohidrato de un polipéptido ActRIIA). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIA se fusiona con un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Tal y como se usa en el presente documento, el término «dominio estabilizador» no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como ocurre en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas tales como un resto carbohidrato o un polímero no proteináceo tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, se pueden usar con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento formas aisladas y/o purificadas de polipéptidos ActRIIA que se aislan de, o están sustancialmente libres de, otras proteínas. Generalmente, los polipéptidos ActRIIA se pueden producir mediante expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

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

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

En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico aislado o recombinante que codifican polipéptidos ActRIIA pueden ser al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 4 o 5. Un experto en la materia comprenderá que se pueden usar secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 4 o 5 y variantes de la SEQ ID NO: 4 o 5 en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento. En realizaciones adicionales, tales secuencias de ácido nucleico se pueden aislar, recombinar y/o fusionar a una secuencia de nucleótido heterólogo, o pueden proceder de una genoteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos usados en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos determinada por la SEQ ID NO: 4 o 5, la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 4 o 5, o fragmentos de la misma. Un experto en la materia entenderá que se pueden modificar las condiciones de rigurosidad adecuadas que facilitan la hibridación del ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación 6,0 veces en cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius seguida de un lavado de 2,0 veces con SSC a 50 grados Celsius. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 veces con SCC a 50 grados Celsius a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 veces con SCC a 50 grados Celsius. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 grados Celsius, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 grados Celsius. Se puede variar tanto la temperatura como la sal, o se puede mantener constante la temperatura o la concentración de sal y modificar la otra variable. En una realización, con los métodos y las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar ácidos nucleicos que se hibridan en las condiciones de baja rigurosidad de 6 veces con SCC a temperatura ambiente seguida de un lavado de 2 veces con SCC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos expuestos en las SEQ ID NO: 4 o 5 debido a la degeneración del código genético, también se pueden usar en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas 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 para histidina), pueden derivar en mutaciones «silenciosas» que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de secuencia de ADN que derivan en cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objetivo seguirán existiendo entre las células de mamíferos. Un experto en la materia comprenderá que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína concreta pueden existir entre individuos de una determinada especie debido a la variación alélica natural.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se pueden conectar de forma operativa a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras de un constructo de expresión. Generalmente, las secuencias de nucleótidos reguladoras serán adecuadas para la célula huésped usada para la expresión. En la técnica se conocen diversos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped.

Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de promotores, secuencias líder o señal, sitios de unión de ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o secuencias activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles tal y como se conocen en la técnica se contemplan en el presente documento. Los promotores pueden ser promotores presentes de forma natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión puede estar insertado en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y varían en función de la célula huésped usada.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico usado en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento se puede proporcionar en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIA y está operativamente conectado a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para la expresión directa del polipéptido ActRIIA. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, 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 están operativamente conectadas a ella, en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIA. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos del SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, las regiones operadoras y promotoras principales del fago lambda, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores α de apareamiento de la levadura, el promotor de poliedros del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de células procariotas y 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 huésped que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Asimismo, se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante usado en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento se puede producir mediante ligamiento del gen clonado, o una porción del mismo, a un vector adecuado para expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, aviar, insectos o mamíferos) o en 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 en mamíferos contienen tanto secuencias procariotas, para facilitar la propagación del vector en la bacteria, como una o más unidades de transcripción eucariotas, que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHg4 son ejemplos de vectores de expresión en mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias procedentes de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y selección de la resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en eucariotas. Como alternativa, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Más adelante, en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales). Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica.

Para ver otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como para células eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión en baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión en 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 el pBlueBac III que contiene β-gal).

Los vectores se pueden diseñar para la producción de los polipéptidos ActRIIA objetivo en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como resultará evidente, los constructos génicos objetivo se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos ActRIIA objetivo en células propagadas en cultivo, p. ej., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o variantes proteicas, para su purificación.

Las células huésped 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 objetivo se pueden usar en la producción de polipéptidos ActRIIA adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. La célula huésped 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 las de *E. coli*, en células de insectos (por ejemplo, usando un sistema de expresión basado en baculovirus), en levaduras o en células de mamíferos. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

Por consiguiente, en el presente documento se desvelan métodos de producción de polipéptidos ActRIIA. Por ejemplo, se puede cultivar una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIA en condiciones adecuadas que permitan que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIA. El polipéptido ActRIIA se puede secretar y aislar a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIA. Como alternativa, el polipéptido ActRIIA se puede retener en el citoplasma o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar y lisar, aislando así la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medio y otros subproductos. Los medios adecuados para cultivo celular se conocen bien en la técnica. Los polipéptidos ActRIIA objetivo se pueden aislar del medio de cultivo celular, las células huésped o ambos usando técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoadsorción con anticuerpos específicos para epítopos concretos de los polipéptidos ActRIIA y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al 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 consigue mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en columna de sefarosa Q, cromatografía en columna de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con retención del virus por filtración y sustitución de tampón. Tal y como se ha demostrado en el presente documento, la proteína ActRIIA-Fc se purificó hasta una pureza de > 98 % tal y como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y de > 95 % tal y como se determinó por SDS-PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para conseguir los efectos deseados sobre los huesos de los ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otra realización, un gen de fusión que codifica para una secuencia líder de purificación, tal como la secuencia de un sitio de escisión de la poli-(His)/enteroquinasa del extremo N-terminal de la porción deseada de un polipéptido ActRIIA recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina del ion metálico Ni²⁺. A continuación, la secuencia líder de purificación se puede retirar posteriormente mediante tratamiento con enterokinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIA purificado (p. ej., véase Hochuli y col., (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht y col., *PNAS USA* 88:8972).

Las técnicas de fabricación de genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican para diferentes secuencias polipeptídicas se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para ligamiento, digestión con enzima de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según convenga, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligamiento enzimático. En otra realización, puede sintetizarse el gen de fusión mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden alinearse posteriormente para generar una secuencia génica químérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

La proteína de fusión ActRIIA-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX B1 1 transfectadas de forma estable a partir de un vector pAID4 (origen de replicación/potenciador de SV40, promotor de CMV), usando una secuencia líder del plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 9. La porción Fc es una secuencia de IgG1 humana, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, tras la expresión, la proteína contenida tiene, de media, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIA-Fc.

En ciertas realizaciones la semivida en suero de una fusión ActRIIA-Fc puede ser de 25-32 días en pacientes humanos. Además, el material expresado en la célula CHO puede tener una afinidad por el ligando de activina B más alta que la informada para una proteína de fusión ActRIIA-hFc expresada en células 293 humanas (del Re y col., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35). Además, sin querer limitarnos a la teoría, el uso de la secuencia líder de

- 5 TPA permitió una producción mayor que otras secuencias líder y, a diferencia de la ActRIIA-Fc expresada con una secuencia líder nativa, puede proporcionar una secuencia N-terminal de alta pureza. El uso de la secuencia líder nativa puede dar dos especies principales de ActRIIA-Fc que tienen una secuencia N-terminal diferente.

(b) INHIBIDORES DE ACTRIIB

Tal y como se usa en el presente documento, el término «ActRIIB» se refiere a una familia de proteínas que son receptores tipo IIB de activina (ActRIIB) de cualquier especie y variantes procedentes de tales proteínas ActRIIB mediante mutagénesis u otra modificación. Se entiende que la referencia a ActRIIB en el presente documento es una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas del receptor. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región 10 rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con prevista actividad serina/treonina quinasa.

15 Los inhibidores de ActRIIB para uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos ActRIIB solubles de unión a activina; anticuerpos que se unen a activina (concretamente a las subunidades A o B de activina, también conocidas como β A o β B) y alteran la unión a ActRIIB; anticuerpos que se unen a ActRIIB y alteran la unión a activina; proteínas que no son anticuerpos seleccionadas para unión a activina o ActRIIB y péptidos aleatorios seleccionados para unión a activina o ActRIIB que se pueden conjugar a un dominio Fc.

20 En ciertas realizaciones, dos o más proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina o ActRIIB, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión tipo I (por ejemplo, un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, se pueden enlazar para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe el ActRIIB y, por tanto, se pueden usar en las 25 composiciones y los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, los antagonistas del eje de señalización Activina-ActRIIB que inhiben el ActRIIB, entre los que se incluyen aptámeros de ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y otros agentes, se usan en las composiciones y los métodos del presente documento.

(i) Inhibidores de ActRIIB que comprenden polipéptidos ActRIIB

30 Tal y como se usa en el presente documento, el término «polipéptido ActRIIB» se refiere a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de un miembro de la familia ActRIIB presente de forma natural, así como a cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retiene 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 un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB y, opcionalmente, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad 35 de secuencia. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o la activina. Un ejemplo de un polipéptido ActRIIB incluye el polipéptido precursor del ActRIIB humano (SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28). Con respecto al polipéptido precursor del ActRIIB cuya secuencia de aminoácidos está representada por la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 28 (es decir, el polipéptido precursor del ActRIIB humano), el péptido señal del polipéptido precursor del ActRIIB humano está localizado en los aminoácidos 1 a 18; el dominio extracelular está 40 localizado en los aminoácidos 19 a 134 y los sitios potenciales de N-glicosilación están localizados en las posiciones de aminoácidos 42 y 65. La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor del ActRIIB humano de SEQ ID NO: 16 se desvela como SEQ ID NO: 19 (la SEQ ID NO: 19 aporta una alanina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64, pero un experto en la materia la podría modificar fácilmente usando métodos conocidos en la técnica para aportar en su lugar una arginina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 45 64). Véase la Tabla 6 para ver una descripción de las secuencias.

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

55 En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y los 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 de ActRIIB o la porción del mismo son solubles. Formas modificadas de polipéptidos ActRIIB ilustrativas se desvelan en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.º de publicación 20090005308 y 20100068215.

En realizaciones específicas, los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son polipéptidos ActRIIB solubles. El término «polipéptido ActRIIB soluble» generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB, incluyendo cualquier dominio extracelular de una proteína ActRIIB presente de forma natural, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo 5 mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Los polipéptidos ActRIIB solubles se pueden unir a activina; sin embargo, la proteína ActRIIB de tipo salvaje no exhibe selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. En ciertas realizaciones, se pueden usar formas alteradas de ActRIIB con diferentes propiedades de unión en los 10 métodos proporcionados en el presente documento. Tales formas alteradas se desvelan, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional con n.º de publicación. WO 2006/012627 y WO 2010/019261. Se puede aportar especificidad añadida a las proteínas ActRIIB nativas o alteradas mediante acoplamiento con un segundo agente de 15 unión a activina selectivo. Entre los polipéptidos ActRIIB ejemplares se incluye el dominio extracelular de un polipéptido ActRIIB humano (por ejemplo, las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43).

Se ha demostrado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia extracelular de ActRIIB desvelada por Hilden 20 y col. (Blood, 1994, 83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, la SEQ ID NO: 16 (en el presente documento denominada «A64»), posee una afinidad relativamente baja por la activina y el GDF-11. Por el contrario, una proteína 25 de fusión Fc con una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB (en el presente documento denominada «R64») tiene una afinidad por la activina y el GDF-11 en el intervalo de nanomolar bajo a picomolar alto (véase, por e. ej., la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de publicación 20100068215).

En la SEQ ID NO: 28 se presenta una secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB con una arginina en la 30 posición 64. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados de acuerdo con las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden comprender (i) una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, la SEQ ID NO: 16 o (ii) una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, la SEQ ID NO: 28. En 35 otras realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados de acuerdo con las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden comprender un aminoácido que no sea alanina o arginina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.

Se ha demostrado que una delección del nudo de prolina en el C-terminal del dominio extracelular de ActRII reduce la 30 afinidad del receptor por la activina (véase, p. ej., Attisano y col., Cell, 1992, 68(1):97-108). Una proteína de fusión ActRIIB que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 28 (es decir, SEQ ID NO: 32), «ActRIIB(20-119)-Fc», tiene menor afinidad de unión a GDF-11 y activina que una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 35 20-134 de la 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 yuxtapamembrana completo. Sin embargo, una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-129 de la SEQ ID NO: 28, «ActRIIB(20-129)-Fc» retiene una actividad similar, pero un tanto menor», que el dominio extracelular no truncado de ActRIIB, incluso aunque la región del nudo de prolina se haya alterado. Por tanto, todos los polipéptidos ActRIIB que comprenden dominios que se detienen en los aminoácidos 134, 133, 40 132, 131, 130 y 129 de la SEQ ID NO: 28 (o SEQ ID NO: 16) se espera que sean activos, pero los constructos que se detienen en los aminoácidos 133 o 134 pueden ser los más activos. De forma similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando en grandes márgenes, tal y como indica el hecho de que las mutaciones P129 y P130 de la SEQ ID NO: 28 no disminuyen significativamente la unión al ligando. Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB usados de acuerdo con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (es decir, la cisteína final) de la SEQ 45 ID NO: 28 (o SEQ ID NO: 16); sin embargo, las formas que terminan en, o entre, las posiciones 109 y 119 de la SEQ ID NO: 28 (o SEQ ID NO: 16) se espera que tengan una capacidad de unión al ligando reducida.

El aminoácido 29 de la SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 28 representa la cisteína inicial de la secuencia del precursor de ActRIIB. Se espera que un polipéptido ActRIIB que comience en el aminoácido 29 del N-terminal de la SEQ ID NO: 50 16 o SEQ ID NO: 28, o antes de esta posición de aminoácido, retendrá la actividad de unión al ligando. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 introduce una secuencia de N-glicosilación sin afectar sustancialmente a la unión al ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el sitio de escisión del péptido señal y la región entrecruzada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, se toleran bien. En concreto, los polipéptidos ActRIIB que comienzan en las 55 posiciones de aminoácidos 20, 21, 22, 23 y 24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 retendrán su actividad y los polipéptidos ActRIIB que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 también se espera que retengán su actividad. Un polipéptido ActRIIB que comience en la posición de aminoácido 22, 23, 24 o 25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 tendrá la mayor actividad.

En resumen, las porciones activas (es decir, los polipéptidos ActRIIB) de la proteína precursora de ActRIIB (es decir, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) para su uso de acuerdo con los métodos y las composiciones descritos en el 60 presente documento generalmente comprenderán los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, y tales polipéptidos ActRIIB pueden, por ejemplo, comenzar en un residuo correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 19-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminar en una posición correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. Entre los ejemplos concretos de polipéptidos ActRIIB abarcados en el presente documento se incluyen los que empiezan en una posición de aminoácido de 19-29,

- 20-29 o 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en una posición de aminoácido de 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. Otros ejemplos concretos de polipéptidos ActRIIB abarcados en el presente documento incluyen los que empiezan en una posición de aminoácido de 20-24 (o 21-24 o 22-25) de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en una posición de aminoácido de 109-134 (o 109-133), 5 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. También se contemplan variantes de polipéptidos ActRIIB que se encuentran dentro de estos intervalos, concretamente las que tienen al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.
- En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el 10 presente documento comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB. El truncamiento puede estar en el extremo carboxilo terminal y/o en el extremo amino terminal del polipéptido ActRIIB. En ciertas realizaciones, el truncamiento 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 en comparación con el dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, el truncamiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 15 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos N-terminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, el truncamiento 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 C-terminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. Por ejemplo, las formas truncadas de ActRIIB incluyen polipéptidos con 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, donde las posiciones de los aminoácidos se refieren a las 20 posiciones de los aminoácidos en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.
- Las formas truncadas ejemplares de ActRIIB incluyen (i) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (opcionalmente, que empiezan en 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (ii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (opcionalmente, que 25 empiezan en 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (iii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (opcionalmente, que empiezan en 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (iv) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (v) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (vi) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (vii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (viii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (ix) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (x) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (xi) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y (xii) polipéptidos que empiezan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En una realización específica, un polipéptido 30 ActRIIB comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que empieza en la posición de aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y termina en la posición de aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En otra realización específica, un polipéptido ActRIIB consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, o 43.
- Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento 45 se puede producir como un homodímero. Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y los 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 los métodos descritos en el presente documento puede 50 comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos adicionales en comparación con la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.
- En realizaciones específicas, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el 55 presente documento comprenden un dominio extracelular de ActRIIB con una o más sustituciones/mutaciones de aminoácidos. Tal sustitución/mutación de aminoácidos puede ser, por ejemplo, un intercambio entre la leucina de la posición de aminoácido 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 por un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. Por ejemplo, en los polipéptidos del dominio extracelular de ActRIIB se puede alterar la posición L79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11)

alteradas. Las mutaciones L79A y L79P reducen la unión a GDF-11 en mayor grado que la unión a activina. Las mutaciones L79E y L79D retienen la unión a GDF-11, pero demuestran una gran reducción de la unión a activina.

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

Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, mediante cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del correspondiente fragmento del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como la síntesis química en fase sólida mediante los métodos Fmoc o t-Boc de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o mediante síntesis química) y ensayar para identificar los fragmentos peptídicos que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o de la señalización mediada por activina.

Además, se pueden obtener las variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, mediante cribado de bibliotecas de polipéptidos modificados producidos recombinantemente a partir de los correspondientes ácidos nucleicos mutagenizados que codifican un polipéptido ActRIIB. Las variantes se pueden producir y ensayar para identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o de la 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 entre las 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 al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las 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, mediante modificación de la estructura de un polipéptido ActRIIB para propósitos tales como la mejora de la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, la vida útil de almacenamiento ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Cuando se seleccionan tales polipéptidos ActRIIB modificados para retener la unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIB presentes en la naturaleza. También se pueden producir polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, cabe esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (p. ej., mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB deriva en un homólogo funcional mediante evaluación de la capacidad de la variante del polipéptido ActRIIB para producir una respuesta en las células similar a la del polipéptido ActRIIB de tipo salvaje.

En los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar mutantes de un polipéptido ActRIIB, en concreto conjuntos de mutantes combinatoriales de un polipéptido ActRIIB y mutantes de truncamiento; los pools de mutantes combinatoriales son especialmente útiles para la identificación de secuencias de variantes funcionales. El propósito del cribado de tales bibliotecas combinatoriales puede ser el de generar, por ejemplo, variantes del polipéptido ActRIIB que puedan actuar como agonistas o como antagonistas o, como alternativa, que posean actividades novedosas en conjunto.

Se ha demostrado que el bolsillo de unión al ligando de ActRIIB viene definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En estas posiciones se espera que se toleren mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que las R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es una K en Xenopus, lo que indica que se tolerarán bien aminoácidos básicos en esta posición. 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 se tolerarán bien en esta posición. Por tanto, una fórmula general para un polipéptido ActRIIB para uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento es una que comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, pero que opcionalmente empieza en una posición de aminoácido que varía de 20-24 o 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y termina en una posición de aminoácido que varía de 129-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, y no comprende más de 1, 2, 5 o 15 cambios conservativos de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones de aminoácidos 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 del bolsillo de unión al ligando. Tal polipéptido ActRIIB puede retener más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 16 o r SEQ ID NO: 28. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los cuales se puede tolerar especialmente bien la

variabilidad, incluyen los extremos carboxilo y amino terminales del dominio extracelular de ActRIIB y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (N65A) mejora realmente la unión al ligando en la A64 original y, por tanto, se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión al ligando en la R64 original. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 de la A64 original y, por tanto, demuestra es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por tanto, otro residuo básico, tal como H, se puede tolerar bien en la posición 64.

Como ejemplo específico de un polipéptido ActRIIB con una mutación en el dominio de unión al ligando, se puede mutar el residuo de aminoácido positivamente cargado Asp(D80) del dominio de unión al ligando de ActRIIB a un residuo de aminoácido diferente de tal modo que la variante de polipéptido ActRIIB se una preferentemente a GDF8 y no a activina. En una realización específica, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrofóbico. Como ejemplo específico adicional, el residuo hidrofóbico L79 se puede alterar a los aminoácidos ácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir enormemente la unión a activina a la vez que se retiene la unión a GDF11. Como bien sabe un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas se pueden hacer a nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccional o síntesis química. Tales técnicas se conocen bien en la técnica.

En realizaciones específicas, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento comprenden una proteína de fusión/conjugada que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a activina) de un receptor ActRIIB conectado a una porción Fc de un anticuerpo. Tales proteínas de fusión/conjugadas pueden comprender cualquiera de los polipéptidos ActRIIB descritos en el presente documento (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO:17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 o 43), cualquiera de los polipéptidos conocidos en la técnica o cualquiera de los polipéptidos ActRIIB generados usando métodos conocidos en la técnica y/o proporcionados en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el dominio extracelular está conectado a una porción Fc de un anticuerpo a través de un conector, por ejemplo, un conector peptídico. Los conectores ejemplares incluyen secuencias polipeptídicas cortas tales como de 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de aminoácidos (por ejemplo, residuos de glicina), tal 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 residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p. ej., una mutación Asp-265) tiene menor capacidad de unión al receptor Fc que un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asn-434) tiene mayor capacidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) de estructura similar a una molécula MHC clase I que un dominio Fc de tipo salvaje. Las proteínas de fusión ejemplares que comprenden un dominio extracelular de ActRIIB soluble fusionado a un dominio Fc se exponen en las SEQ ID NO: 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 y 47.

En una realización específica, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, conectado a una porción Fc de un anticuerpo, donde dicho inhibidor de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 y 47. En otra realización específica, los inhibidores del ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, conectado a una porción Fc de un anticuerpo, donde dicho inhibidor del ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 y 47.

En una realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de la IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y los 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 la IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se va a usar en las composiciones y los 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 la IgG1, donde el dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano posee una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En una realización, la sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 79 de la 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 ActRIIB que se va a usar en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento es las SEQ ID NO: 24 o 25, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de la IgG1, donde dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28 con una mutación L79D. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ActRIIA-Fc de SEQ ID NO: 24 se presenta en la SEQ ID NO: 45.

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

- 5 Los sitios de reconocimiento de la glicosilación por conexión a asparagina generalmente comprenden una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (donde «X» es cualquier aminoácido), que es reconocida específicamente por las enzimas de glicosilación celular adecuadas. La alteración también se puede hacer por adición de, o sustitución de, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo salvaje (para sitios de O-glicosilación). Una variedad de sustituciones o delecciones en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera y tercera de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la 10 segunda posición) deriva en la no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en un polipéptido ActRIIB es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el(s) azúcar(es) se pueden fijar a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (d) grupos hidroxilo 15 libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la 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 and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La eliminación de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIB se puede conseguir químicamente y/o enzimáticamente. La deglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición 20 del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento deriva en la escisión de la mayoría de los azúcares, o todos ellos, excepto el azúcar de conexión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando la secuencia de aminoácidos intacta. La deglicosilación química se describe con más detalle en Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y en Edge y col. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos carbohidrato en polipéptidos ActRIIB se puede conseguir mediante el uso 25 de una variedad de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura y col. (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 todas las células de mamíferos, levadura, insectos y plantas pueden introducir diferentes 30 patrones de glicosilación que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para uso en humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que permita una glicosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, pero se prevé que otros sistemas de expresión, tales como otras líneas celulares de expresión en mamíferos, líneas celulares de levadura con enzimas de glicosilación modificadas y células de insectos, también pueden ser útiles.

- En realizaciones específicas, se pueden usar en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento polipéptidos ActRIIB mutados que comprenden la adición de un sitio de N-glicosilación adicional (N-X-S/T) que 35 aumenta la semivida en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc en comparación con la forma ActRIIB(R64)-Fc. En una realización específica, la introducción de una asparagina en la posición 24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (A24N) deriva en la creación de una secuencia NXT que confiere una semivida más larga. Se pueden encontrar otras secuencias NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque la última puede que no esté eficientemente 40 glicosilada con R en la posición 64 (es decir, en polipéptidos R64). Generalmente, las secuencias N-X-S/T se pueden introducir en posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando de ActRIIB, lo cual se ha comentado con detalle 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 la 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 Fc u otro 45 componente de fusión. Tal sitio se puede introducir con mínimo esfuerzo mediante la introducción de una N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistentes o mediante introducción de una S o T en una posición correspondiente a una N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de N-glicosilación son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinada con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T (con todas las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones que se pueden 50 encontrar en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28). Cualquier S que se prevea que va a ser glicosilada se puede alterar a una T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección otorgada por la glicosilación. Asimismo, cualquier T que se prevea que va a ser glicosilada se puede alterar a una S. Por tanto, las alteraciones S67T y S44T están abarcadas en el presente documento. Asimismo, en una variante A24N se puede usar una alteración S26T. Por consiguiente, un polipéptido ActRIIB puede incluir una o más secuencias consenso de N-glicosilación no endógenas adicionales.
- 55 Se puede usar una variedad de ensayos de cribado para evaluar variantes del polipéptido ActRIIB. Por ejemplo, se puede cribar una variante de polipéptido ActRIIB para que tenga capacidad de unión a un ligando de ActRIIB, para que evite la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB o para que interfiera con la señalización provocada por un ligando de ActRIIB. La actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes también se puede ensayar en un ensayo *in vivo* o en células.
- 60 Se pueden generar variantes derivadas combinatorialmente que tengan una potencia selectiva, o generalmente mayor, que un polipéptido ActRIIB presente de forma natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan semivididas intracelulares drásticamente diferentes de las del correspondiente polipéptido ActRIIB de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica

u otros procesos celulares que deriven en la destrucción o inactivación de un polipéptido ActRIIB nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIB mediante modulación de la semivida de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido ActRIIB en el paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatorial mediante una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que incluyen, todos ellos, al menos una porción de secuencias de polipéptidos ActRIIB potenciales. Por ejemplo, se puede ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos a secuencias de genes de tal forma que el conjunto degenerado de secuencias de nucleótidos de polipéptido ActRIIB potencial se pueda expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para expresión en fago).

La biblioteca de homólogos potenciales se puede generar de muchas formas a partir de una secuencia de oligonucleótido degenerada. La síntesis química de una secuencia de gen degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automatizado y, a continuación, se pueden ligar los genes sintéticos a un vector de expresión adecuado. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, S A (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura y col., (1981) *Recombinant DNA*, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura y col., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura y col., (1984) *Science* 198:1056; Ike y col., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott y col., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts y col., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin y col., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla y col., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; así como las patentes US5223409, US5198346 y US5096815).

Como alternativa, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatorial. Por ejemplo, se pueden generar y aislar variantes de polipéptido ActRIIB a partir de una biblioteca mediante cribado usando, por ejemplo, mutagénesis dirigida por barrido de alanina y similares (Ruf y col., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang y col., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint y col., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg y col., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima y col., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman y col., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838 y Cunningham y col., (1989) *Science* 244:1081-1085); mediante mutagénesis dirigida por barrido de conector (Gustin y col., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown y col., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight y col., (1982) *Science* 232:316); mediante mutagénesis por saturación (Meyers y col., (1986) *Science* 232:613); mediante mutagénesis dirigida por PCR (Leung y col., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller y col., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.y Greener y col., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). La mutagénesis dirigida por barrido de conector, especialmente en un entorno combinatorial, es un método atractivo para la identificación de formas truncadas (bioactivas) de polipéptido ActRIIB.

En la técnica se conoce una amplia gama de técnicas para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales fabricadas mediante mutaciones y truncamientos puntuales y, por ende, para el cribado de genotecas de ADNc para productos génicos que tienen una determinada propiedad. Generalmente, tales técnicas serán adaptables para el cribado rápido de genotecas generadas mediante la mutagénesis combinatorial de polipéptidos ActRIIB. Habitualmente, las bibliotecas generalmente usadas para el cribado de genotecas grandes comprenden la clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatoriales en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente sencillo del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden comprender modificaciones postraduccionales además de las presentes de forma natural en los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB se pueden ensayar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Cuando se produce un polipéptido ActRIIB en las células mediante escisión de una forma incipiente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para corregir el plegamiento y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIB.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante (Fc) de una cadena pesada de inmunoglobulina,

- proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión de tal forma que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son especialmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para la purificación por afinidad, se usan matrices para cromatografía de afinidad pertinentes, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y con níquel o cobalto. Muchas de tales matrices se comercializan en forma de «kit», tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen), útil con parejas de fusión (HIS6). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión de tal modo que facilite la detección de los polipéptidos ActRIIB. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como «epítopos marcadores», que normalmente son secuencias peptídicas cortas para las que se dispone de un anticuerpo específico. Entre los epítopos marcadores bien conocidos para los que es fácil disponer de anticuerpos monoclonales específicos se incluyen el epítopo FLAG, el virus de la gripe, la hemaglutinina (HA) y los marcadores c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión para proteasas, tal como para el factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por consiguiente, libere de ahí las proteínas recombinantes. A continuación, las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión mediante 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 entiende cualquier cosa que aumenta la semivida en suero, independientemente de si lo hace mediante reducción de la destrucción, reducción de la eliminación por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren las propiedades farmacocinéticas deseadas a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Entre otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar se incluyen los dominios multimerizantes (p. ej., dimerizantes, tetramerizantes) y los dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento óseo o el crecimiento muscular, según convenga).
- Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden adoptar cualquier disposición que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede colocar en posición C-terminal respecto a un dominio heterólogo o, como alternativa, un dominio heterólogo se puede colocar en posición C-terminal respecto a un polipéptido ActRIIB. El dominio del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en las posiciones C- o N-terminal de ambos dominios o entre los dominios.
- En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden contener una o más modificaciones que sean capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida *in vivo* de los polipéptidos ActRIIB, mejorar la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducir la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones estabilizadoras 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 glicosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIB) y modificaciones de restos carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos carbohidrato de un polipéptido ActRIIB). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Tal y como se usa en el presente documento, el término «dominio estabilizador» no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como ocurre en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas tales como un resto carbohidrato o un polímero no proteináceo tal como polietilenglicol.
- En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento usan formas aisladas o purificadas de polipéptidos ActRIIB, es decir, polipéptidos que se aíslan de, o están sustancialmente libres de, otras proteínas, se pueden usar en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Generalmente, los polipéptidos ActRIIB se producirán generalmente mediante expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.
- En ciertos aspectos, los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento están codificados por ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes, incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritos en el presente documento. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 19 codifica el polipéptido precursor del ActRIIB humano presente de forma natural. Los ácidos nucleicos objetivo pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos de fabricación de polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en una estrategia de terapia génica).
- En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento se entiende que además incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 19, así como variantes de las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43). Las secuencias de nucleótidos de las variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o delecciones de nucleótidos, tal como las variantes alélicas.
- En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico aislado o recombinante que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento

son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 19 o a las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43). Un experto en la materia comprenderá que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 19 o las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos

5 ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43) y variantes de la SEQ ID NO: 19 o las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43) se pueden usar con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de

10 nucleótido heterólogo, o en una genoteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 19 o a las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican

15 las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43) y secuencias complementarias de la SEQ ID NO: 19 o las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43), o fragmentos de las mismas. Un experto en la materia entenderá que se pueden modificar las condiciones de rigurosidad adecuadas que facilitan la

20 hibridación del ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación 6,0 veces en cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius seguida de un lavado de 2,0 veces con SSC a 50 grados Celsius. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 veces con SCC a 50 grados Celsius a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 veces con SCC a 50 grados Celsius. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a

25 temperatura ambiente, aproximadamente 22 grados Celsius, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 grados Celsius. Se puede variar tanto la temperatura como la sal, o se puede mantener constante la temperatura o la concentración de sal y modificar la otra variable. En una realización, con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento se pueden usar ácidos nucleicos que se hibridan en las condiciones de baja rigurosidad de 6 veces con SCC a temperatura ambiente seguida de un lavado de 2 veces con SCC a temperatura ambiente.

30 Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos expuestos en la SEQ ID NO: 19 o las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43) debido a la degeneración del código genético, también se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que

35 especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina), pueden derivar en mutaciones «silenciosas» que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de secuencia de ADN que derivan en cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objetivo seguirán existiendo entre las células de mamíferos. Un experto en la materia comprenderá que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína concreta pueden existir entre individuos de una determinada especie debido a la variación alélica natural. Todos, o cualquiera de, tales variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes

40 se pueden usar con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento se pueden conectar operativamente a una o más secuencias de nucleótido reguladoras en un constructo de expresión. Generalmente, las

45 secuencias de nucleótidos reguladoras serán adecuadas para la célula huésped usada para la expresión. En la técnica se conocen diversos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de promotores, secuencias líder o señal, sitios de unión de ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias

50 potenciadoras o secuencias activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles, tal y como se conocen en la técnica, se pueden usar con los métodos y las composiciones descritas en el presente documento. Los promotores pueden ser promotores presentes de forma natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el

55 constructo de expresión puede estar insertado en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán en función de la célula huésped usada.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento se proporcionan en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y está operativamente conectada a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para la expresión directa del polipéptido ActRIIB. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, 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 están operativamente conectadas a ella, en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos del SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, las regiones operadoras y promotoras principales del fago lambda, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores α de apareamiento de la levadura, el promotor de poliedros del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de células procariotas y 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 huésped que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Asimismo, se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante se puede producir mediante ligamiento del gen clonado, o una porción del mismo, a un vector adecuado para expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, aviar, insectos o mamíferos) o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como E. coli.

Algunos vectores de expresión en mamíferos contienen tanto secuencias procariotas, para facilitar la propagación del vector en la bacteria, como una o más unidades de transcripción eucariotas, que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHg son ejemplos de vectores de expresión en mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias procedentes de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y selección de la resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en eucariotas. Como alternativa, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Más adelante, en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales). Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para ver otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como para células eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión en baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión en 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 el pBlueBac III que contiene β -gal).

En una realización, se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como resultará evidente, los constructos génicos objetivo se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos ActRIIB objetivo en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o variantes proteicas, para su purificación.

Las células huésped transfectadas con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 19 o las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43)) para uno o más de los polipéptidos ActRIIB objetivo se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede expresar en células bacterianas tales como las de E. coli, en células de insectos (por ejemplo, usando un sistema de expresión basado en baculovirus), en levaduras o en células de mamíferos. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

Por consiguiente, en el presente documento se desvelan métodos de producción de los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede cultivar una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB en condiciones adecuadas que permitan que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB se puede secretar y aislar a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIB. Como alternativa, el polipéptido ActRIIB se puede retener en el citoplasma o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar y lisar, aislando así la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medio y otros subproductos. Los medios adecuados para cultivo celular se conocen bien en la técnica. Los polipéptidos ActRIIB objetivo se pueden aislar del medio de cultivo celular, las células huésped o ambos usando técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por

inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos concretos de los polipéptidos ActRIIB y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al 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 consigue mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en columna de sefarosa Q, cromatografía en columna de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con retención del virus por filtración y sustitución de tampón. Tal y como se ha demostrado en el presente documento, la proteína ActRIIB-Fc se purificó hasta una pureza de > 98 %, tal y como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y de > 95 % tal y como se determinó por SDS-PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para conseguir los efectos deseados sobre los huesos de los ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otra realización, un gen de fusión que codifica para una secuencia líder de purificación, tal como la secuencia de un sitio de escisión de la poli-(His) /enteroquinasa del extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina del ión metálico Ni²⁺. A continuación, la secuencia líder de purificación se puede retirar posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIB purificado (por ejemplo, véase Hochuli y col., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht y col., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas de fabricación de genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican para diferentes secuencias polipeptídicas se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para ligamiento, digestión con enzima de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según convenga, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligamiento enzimático. En otra realización, puede sintetizarse el gen de fusión mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden alinearse posteriormente para generar una secuencia génica químérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

La proteína de fusión ActRIIB-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX B11 transfectadas de forma estable a partir de un vector pAID4 (origen de replicación/potenciador de SV40, promotor de CMV), usando una secuencia líder del plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 8. La porción Fc puede comprender una secuencia Fc de IgG1 humana, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, tras la expresión, la proteína contenida tiene, de media, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIB-Fc.

En ciertas realizaciones la semivida en suero de una fusión ActRIIB-Fc puede ser de 25-32 días en pacientes humanos. Además, el material expresado en la célula CHO puede tener una afinidad por el ligando de activina B más alta que la informada para una proteína de fusión ActRIIB-hFc expresada en células 293 humanas (del Re y col., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35). Además, sin querer ceñirnos a la teoría, el uso de la secuencia líder de TPA permitió una producción mayor que otras secuencias líder y, a diferencia de la ActRIIB-Fc expresada con una secuencia líder nativa, puede proporcionar una secuencia N-terminal de alta pureza. El uso de la secuencia líder nativa puede dar dos especies principales de ActRIIB-Fc que tienen una secuencia N-terminal diferente.

(ii) Otros inhibidores del receptor ActRII

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

Entre los ejemplos de las categorías de compuestos de ácido nucleico que inhiben los receptores ActRII se incluyen los ácidos nucleicos antisentido, siRNA o constructos de ARNi y constructos de ácidos nucleicos catalíticos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto bicatenario también puede incluir regiones protuberantes o de no complementariedad en las que una de las dos cadenas es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, que significa que el compuesto puede formar una estructura denominada «horquilla» o «tallo-bucle», con una región de estructura de doble hélice.

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 longitud total de la secuencia de ácido nucleico del receptor ActRII o la secuencia de ácido nucleico de la activina (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de una subunidad de activina A o activina B, también denominadas β A o β B). En realizaciones específicas, la región de complementariedad será de al menos 8 nucleótidos y, opcionalmente, al menos 10 o al menos 15 nucleótidos y, opcionalmente, entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede encontrarse en un intrón, una secuencia codificadora o una secuencia no codificadora del transcripto objetivo, tal como la porción de secuencia codificadora. Generalmente, 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 de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un compuesto de ácido nucleico que inhibe un receptor ActRII puede ser un ADN (particularmente para uso como un antisentido), un ARN o un híbrido ARN:ADN. Cualquier cadena puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente ni como ADN ni como ARN. Asimismo, un compuesto de ácido nucleico bicatenario puede ser 5 ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ADN y cualquier cadena también puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente ni como ADN ni como ARN.

Los compuestos de ácido nucleico que inhiben un receptor ActRII pueden incluir cualquier variedad de modificaciones, incluyendo una o modificaciones en el esqueleto (la porción azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo 10 enlaces internucleótido) o la porción básica (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, con frecuencia, contendrá una o más modificaciones para mejorar ciertas características, tales como la estabilidad en el suero, la estabilidad en una célula o la estabilidad en un lugar en el que es probable que se vaya a administrar el compuesto, tal como, por ejemplo, el estómago en el caso de compuestos de administración por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de un constructo de ARNi, la cadena 15 complementaria al transcripto objetivo generalmente será ARN o modificaciones del mismo. La otra cadena puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción dúplex del constructo de ARNi en «horquilla» monocatenario o bicatenario puede, en ciertas realizaciones, tener una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y, opcionalmente, de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud siempre que sirva como sustrato para la proteína Dicer. Los 20 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 los receptores ActRII pueden inhibir la expresión de su objetivo en aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más en condiciones fisiológicas y a una concentración donde un control, con sentido o sin sentido, tiene muy poco o ningún efecto. Las concentraciones para ensayar el efecto de los compuestos de ácido nucleico incluyen 1, 5, 10 micromolar o más.

25 Los inhibidores de los receptores ActRII usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos. Tales anticuerpos incluyen anticuerpos que se unen a activina (particularmente a las subunidades A o B de activina, también conocidas como β A o β B) y alteran la unión al receptor ActRII y anticuerpos que se unen a los polipéptidos del receptor ActRII (por ejemplo, un polipéptido ActRIIA soluble o ActRIIB soluble) y alteran la unión de activina.

30 Usando inmunógenos derivados de un polipéptido del receptor ActRII o un polipéptido de activina, se pueden fabricar antisueros o anticuerpos monoclonales anti-proteína/anti-péptido mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Se puede inmunizar un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo con una forma inmunogénica del polipéptido del receptor ActRII, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de un anticuerpo o una proteína de fusión. Las 35 técnicas que confieren inmunogenicidad a una proteína o un péptido incluyen la conjugación a vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Una porción inmunogénica de un polipéptido del receptor ActRII o de activina se puede administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede monitorizar mediante detección de títulos de anticuerpo en el plasma o el suero. Se puede usar la técnica ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

40 Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido del receptor ActRIIA, se puede obtener antisuero y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden recolectar células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizadoras, tales como células de mieloma, para producir células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, 45 la técnica del hibridoma (originalmente desarrollada por Kohler and Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbar y col., (1983) Immunology Today, 4: 72) y la técnica del hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células de hibridoma se pueden cribar inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido del receptor ActRII y anticuerpos monoclonales aislados de 50 un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

55 El término «anticuerpo», tal y como se usa en el presente documento, incluye fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con un polipéptido objetivo. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales y los fragmentos se pueden cribar para que sean útiles de la misma forma que se ha descrito anteriormente para los anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab)2 mediante tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)2 resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro y producir fragmentos Fab. Un anticuerpo además incluye moléculas biespecíficas, de cadena sencilla, químéricas, humanizadas y completamente humanas que tienen afinidad por un polipéptido del receptor ActRII o de activina conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede incluir además un marcador fijado a él y capaz de ser detectado (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, 60 una enzima o un cofactor de una enzima).

- El anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante, término que abarca cualquier anticuerpo generado en parte mediante técnicas de biología molecular, incluyendo los anticuerpos injertados con CDR o químicos, anticuerpos humanos u otros ensamblados a partir de dominios de anticuerpos seleccionados de bibliotecas, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos de dominio sencillo (por ejemplo, proteínas VH humanas o proteínas VHH de camélidos).
- 5 Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, y en ciertas realizaciones. Por ejemplo, un método de generación de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido del receptor ActRII o a un polipéptido de activina puede comprender la administración a un ratón de una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido antigenógeno efectivo para estimular una respuesta inmune detectable, la obtención de las células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) del ratón y fusión de las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos y el ensayo de los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produzca 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 en las que las células derivadas del hibridoma produzcan el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal se puede purificar a partir del cultivo celular.
- 10 15 El adjetivo «específicamente reactivo con», tal y como se usa para hacer referencia a un anticuerpo, significa, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo tiene una selectividad suficiente entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido del receptor ActRII) y otros antígenos que no son de interés y que el anticuerpo se usa para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo concreto de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como las aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad de unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos monoclonales) a discriminar efectivamente entre los antígenos deseados y los polipéptidos con reactividad cruzada. Una característica que influencia 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, generalmente, los anticuerpos preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10-6, 10-7, 10-8, 10-9 o menos. Dada la extraordinariamente estrecha unión entre la activina y un receptor ActRII, se espera que un anticuerpo neutralizante anti-activina o anti-receptor ActRII tenga generalmente una constante de disociación de 10-10 o menos.
- 20 25 Además, las técnicas usadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se va a usar para unir un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión en solución. Se dispone de una variedad de técnicas diferentes para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos e identificar anticuerpos especialmente convenientes. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmones superficiales (p.ej., el ensayo de unión Biacore.TM., Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de captura (p.ej., el sistema de perlas paramagnéticas IGEN International, Inc., Gaithersburg, Md.), Western blot, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.
- 30 35 40 En ciertas realizaciones, los inhibidores del receptor ActRII para uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen formas alternativas de activina, particularmente las que tienen alteraciones en el dominio de unión al receptor tipo I pueden unirse a receptores tipo II y no formar un complejo ternario activo. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos, tales como las moléculas antisentido, siRNA o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, especialmente, la expresión del receptor ActRII, se pueden usar en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento.
- 45 En otras realizaciones, los inhibidores de los receptores ActRII usados en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son proteínas que no son anticuerpos con actividad antagonista del receptor ActRII, incluyendo inhibina (es decir, la subunidad alfa de la inhibina), follistatina (por ejemplo, follistatina-288 y follistatina-315), Cerberus, proteína relacionada con la follistatina ("FSRP"), endoglina, activina C, alfa(2)-macroglobulina, y una activina A mutante M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108).
- 50 55 60 En una realización específica, el inhibidor del receptor ActRII para uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento es un polipéptido de follistatina que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se une a la activina. El término «polipéptido de follistatina» incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de follistatina presente de forma natural, así como a cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retiene una actividad útil, y además incluye cualquier monómero o multímero funcional de follistatina. Las variantes de polipéptidos de follistatina que retienen propiedades de unión a activina se pueden identificar en base a estudios previos que implican las interacciones de follistatina y activina. Por ejemplo, el documento, WO2008/030367, desvela dominios de follistatina específicos ("FSDs") que han demostrado ser importantes para la unión a activina. Los polipéptidos de follistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier follistatina conocida que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de follistatina y, opcionalmente, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia. Entre los ejemplos de polipéptidos de follistatina se incluye el polipéptido de follistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de la follistatina humana, tal y como se describe en el documento WO2005/025601.
- En una realización específica, el inhibidor del receptor ActRII para uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento es un gen FLRG (follistatin-like related gene) que antagoniza la bioactividad de la activina

y/o se une a la activina. El término «polipéptido FLRG» incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido FLRG presente de forma natural, así como a cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retiene una actividad útil. Las variantes de polipéptidos de FLRG que retienen propiedades de unión a activina se pueden identificar usando métodos rutinarios de ensayo de las interacciones de FLRG y activina. Véase, por ejemplo, la patente US6537966, que se incluye en su totalidad por referencia en el presente documento. Los polipéptidos FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG y, opcionalmente, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia.

En ciertas realizaciones, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de FLRG y los polipéptidos de follistatina incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de follistatina o polipéptidos de FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que facilitan el aislamiento, la detección, la estabilización o la multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se han comentado con detalle anteriormente en relación con los polipéptidos ActRIIA y ActRIIB. En una realización, un inhibidor del receptor ActRII es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de follistatina fusionado a un dominio Fc. En otra realización, un inhibidor del receptor ActRII es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido FLRG fusionado a un dominio Fc.

5.3 ENSAYOS

(a) ENSAYOS DIAGNÓSTICOS

(i) RECAMBIO ÓSEO

Se pueden usar diversos marcadores circulantes del recambio óseo para diagnosticar enfermedades óseas, tales como el recambio óseo bajo. Los marcadores circulantes del recambio óseo son marcadores de la formación de hueso tales como la fosfatasa alcalina específica del hueso (bAP), la osteocalcina, el polipéptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), siendo algunos de ellos marcadores de resorción ósea tales como piridinolina, desoxipiridinolina, fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), TRAP tipo 5b, piridinolina, desoxipiridinolina y telopéptido C-terminal del procolágeno tipo I (ICTP), enlaces cruzados de colágeno en suero u orina (telopéptido N o telopéptido C) y 25-hidroxivitamina D. También se pueden usar ensayos para medir la hormona paratiroides total (PTH). El experto en la materia conoce métodos de diagnóstico por imagen que permiten la evaluación de la densidad mineral ósea (BMD). Véase, p. ej., Tilman B. Druke and 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*. 2009 Aug; 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 patients, *Clin Nephrol*. 2009 Jul;72(1):5-14; Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G., Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in patients with chronic kidney disease Stages 3-5, *Clin Nephrol*. 2008 Oct;70(4):296-305; Drüeke TB., Is parathyroid hormone measurement useful for the diagnosis of renal bone disease?, *Kidney Int*. 2008 Mar;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 patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction., *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Aug;69(2):189-96. Epub 2008 Jan 23. Véase también, Paul D. Miller, Diagnosis and Treatment of Osteoporosis in Chronic Renal Disease, 2009.

Otro marcador para monitorizar la resorción ósea en pacientes con CKD con disfunción renal leve es la concentración en suero de telopéptido N del colágeno tipo I (S-TNX). Véase, p. ej., 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 patients with chronic kidney disease., *Bone*. 2006 Nov;39(5):1067-72. Epub 2006 Jun 16.

También se puede usar la tomografía computerizada cuantitativa (QCT) para determinar el recambio óseo.

(ii) MODELO DE ENFERMEDAD ÓSEA ADINÁMICA

Un modelo de ratón de enfermedad ósea adinámica en un entorno renal es el uso de un modelo de nefrectomía en ratón, tal como el modelo de nefrectomía 5/6 usado en las Secciones 6.2 y 6.3, donde los ratones se alimentan con una dieta pobre en fosfato.

En otro modelo de ratón, los ratones se someten a electrocauterización de un riñón y nefrectomía del otro riñón. Los ratones se alimentan con comida pobre en fosfato suplementada con calcitriol. Véase, p. ej., Lund y col., 2004, *J Am Soc Nephrol* 15:349-369.

(iii) MARCADO ÓSEO CON TETRACICLINA

Una prueba diagnóstica que se puede usar para determinar el tipo de enfermedad ósea asociada a la CKD es la biopsia ósea de cresta ilíaca con doble marcaje con tetraciclina y análisis histomorfométrico del hueso. Véase, p. ej.,

National Kidney Foundation: NKF KDOQI Guidelines.

(iv) CALCIFICACIÓN VASCULAR

La tomografía computerizada sin contraste (CT) para el diagnóstico del grado de calcificación de la arteria coronaria (CAC) y la CT con contraste para angiografía coronaria no invasiva (CTA) son avances generalmente usados para el

- 5 diagnóstico de la enfermedad coronaria obstructiva. También se pueden usar para la evaluación del diagnóstico y pronóstico cardíacos la prueba de esfuerzo con radionúclidos, la determinación de calcio en la arteria coronaria por tomografía computerizada y la angiografía coronaria no invasiva. Véase: Berman DS, Shaw LJ, Hachamovitch R, Friedman JD, Polk DM, Hayes SW, Thomson LE, Germano G, Wong ND, Kang X, Rozanski A., Comparative use of radionuclide stress testing, coronary artery calcium scanning, and noninvasive coronary angiography for diagnostic

10 and prognostic cardiac assessment, Semin Nucl Med. 2007 Jan;37(1):2-16.

La determinación de calcio en la arteria coronaria por tomografía computerizada de pacientes asintomáticos se puede usar a modo comparativo. Por ejemplo, los resultados de la determinación de calcio en la arteria coronaria por tomografía computerizada obtenidos antes del brote de la enfermedad renal se pueden usar a modo comparativo cuando la calcificación vascular está relacionada con la enfermedad renal.

- 15 Los posibles métodos de detección y cuantificación de la calcificación en la arteria coronaria (CAC) incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada por rayos X y tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) de la perfusión miocárdica. Moser KW, O'Keefe JH Jr, Bateman TM, McGhie IA., Coronary calcium screening in asymptomatic patients as a guide to risk factor modification and stress myocardial perfusion imaging, J Nucl Cardiol. 2003 Nov-Dec;10(6):590-8. También se puede usar la tomografía computerizada multidetector (MDCT) para detectar

20 la calcificación vascular (véase, p. ej., Burrill y col., 2007, Postgrad. Med. J. 83(985):698-704).

Otro método diagnóstico para la calcificación vascular es la absorción de 18F-fluorodesoxiglucosa (FDG) en la pared de la aorta torácica combinada con tomografía de emisión de positrones (PET)/tomografía computerizada (CT). Véase: Tatsumi M, Cohade C, Nakamoto Y, Wahl RL., Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis, Radiology. 2003 Dec;229(3):831-7. Epub 2003 Oct 30.

- 25 Incluso, en otra realización, se puede usar CT ultrarrápida para detectar la presencia de enfermedad coronaria aterosclerótica. Véase, p. ej., 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. 1992 Nov;185(2):435-9.

- 30 También se puede usar la tomografía computerizada por haz de electrones para diagnosticar la enfermedad arterial coronaria. Véase: 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 patients with normal, abnormal or equivocal exercise stress test, Eur Heart J. 2000 Oct;21(20):1674-82.

35 Otra prueba para la calcificación vascular considera la composición de las placas en la hipertensión pulmonar plexogénica y tromboembólica. La hipertensión pulmonar tromboembólica crónica está asociada a placas ateroscleróticas con núcleos pultáceos ricos en glicoforina y la hipertensión pulmonar plexogénica a placas fibrosas. El material tromboembólico juega un papel crítico en la formación de núcleos pultáceos cuyo componente principal es la glicoforina procedente de la membrana de los eritrocitos. Por lo tanto, se investigan la hipertensión pulmonar tromboembólica y plexogénica (primaria y secundaria (síndrome de Eisenmenger)). Véase: Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovella F, Viganó M, Tavazzi L, Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation, Heart. 2002 Aug;88(2): 177-82.

- 40 45 El puntaje de Agatston, un sistema de puntaje de calcio basado en mediciones de densidad de las placas de calcio depositadas, puede ser útil para cuantificar la calcificación vascular. En este sistema, se pueden medir los niveles de calcificación vascular mediante tomografía computerizada multidetector (MDCT) y se pueden evaluar las atenuaciones de la velocidad de progresión del puntaje de Agatston (véase p. ej., Sharma y col., 2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:603-611).

Además, la calcificación vascular se puede evaluar usando los métodos descritos en Adragao y col., 2004, Nephrol. Dial. Transplant 19:1480-1488.

- 50 Otro ensayo que se puede usar en la cuantificación de la calcificación vascular en un sujeto es el puntaje de calcio específico de lesión, que comprende un método de medición del calcio resultante de una prueba de CT de calcificación de la arteria coronaria. Este método es descrito por, p. ej., Akram and Voros, 2008, Int. J. cardiovac. Imaging 14:743-749.

(v) ENFERMEDAD RENAL

- 55 La velocidad de filtración glomerular se puede determinar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia para determinar la enfermedad renal. Véase el sitio web de la National Kidney Foundation.

(vi) PARATIROIDISMO SECUNDARIO

El hiperparatiroidismo secundario se produce cuando la glándula paratiroidea produce demasiada hormona paratiroidea (PTH) debido a la presencia de niveles de calcio demasiado bajos o aumento de los niveles de fósforo. Los niveles de calcio, fósforo y PTH se pueden determinar a partir de muestras de sangre.

5 (vii) HIPERFOSFATEMIA

Los niveles anómalamente elevados de fosfato en la sangre se pueden determinar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia.

(b) Ensayos de cribado

10 Se pueden ensayar diversas variantes de polipéptidos de ActRII o variantes de polipéptidos de ActRII solubles para determinar su capacidad de inhibición del receptor ActRII. Además, se pueden ensayar compuestos para determinar su capacidad de inhibición del receptor ActRII. Una vez que se ha confirmado la actividad de los inhibidores de ActRII, se pueden usar con los métodos descritos en el presente documento. ActRII puede ser ActRIIA o ActRIIB. Los ensayos que se muestran a continuación se describen para ActRIIA, pero también se pueden realizar para ActRIIB.

15 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 la destrucción de hueso. Según sea necesario, esto se puede realizar en presencia de una o más proteínas recombinantes que actúan como ligando de ActRIIA (por ejemplo, activina) y se pueden transfectar las células para producir un polipéptido ActRIIA y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRIIA. Asimismo, se puede administrar un polipéptido ActRIIA a un ratón u otro animal y se pueden evaluar una o más propiedades, tales como la densidad o el volumen. También se puede evaluar la velocidad de curación de fracturas óseas. La absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA) es una técnica cuantitativa no invasiva y consolidada para evaluar la densidad ósea en un animal. En humanos, se pueden usar los sistemas DEXA centrales para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores indicadores de la densidad ósea global. Los sistemas DEXA periféricos se pueden usar para evaluar la densidad ósea en huesos periféricos, incluyendo, por ejemplo, los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Los sistemas de diagnóstico por imagen con rayos X, incluyendo los TAC, se pueden usar para evaluar el crecimiento de hueso y la curación de fracturas. Además, la densidad ósea se puede medir usando tomografía computerizada cuantitativa (qCT). También se puede evaluar la resistencia mecánica del hueso.

30 En ciertos aspectos del presente documento, se describe el uso de polipéptidos ActRIIA (p. ej., polipéptidos ActRIIA solubles) y polipéptidos de activina para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la vía de señalización activina-ActRIIA. Los compuestos identificados a través de este cribado se pueden ensayar para evaluar su capacidad de modular el crecimiento o la mineralización óseos *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos se pueden ensayar además en modelos animales para evaluar su capacidad de modular el crecimiento tisular *in vivo*.

35 Hay numerosas estrategias para el cribado de agentes terapéuticos para la modulación del crecimiento tisular dirigidos a activina y polipéptidos ActRIIA. En ciertas realizaciones, se puede llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban los efectos de la activina o los mediados por 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. Como alternativa, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIA a activina. En una realización adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad de interacción con una activina o un polipéptido ActRIIA.

40 Una variedad de formatos de ensayo serán suficientes y, en vista de la presente descripción de la invención, los que no están expresamente descritos en el presente documento, aun así, serán comprendidos por un experto en la materia. Tal y como se describe en el presente documento, los compuestos de ensayo (agentes) usados en el presente documento se pueden crear mediante cualquier método de química combinatoria. Como alternativa, los compuestos objetivo pueden ser biomoléculas presentes de forma natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) 45 que se van a ensayar para determinar su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento tisular se pueden producir, por ejemplo, mediante bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, peptidomiméticos incluidos) o recombinantemente. Los compuestos de ensayo contemplados en el presente documento incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácidos nucleicos. En una realización específica, 50 el agente de ensayo es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 dalton.

55 Los compuestos de ensayo se pueden proporcionar como entidades sencillas y discretas o en bibliotecas de mayor complejidad, tales como las hechas mediante química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros alquílicos, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo en los sistemas de ensayo puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar de otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde

fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes entrecruzadores fotoactivantes o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos, que ensayan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento con el fin de maximizar el número de compuestos analizados en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como los que se pueden obtener con proteínas purificadas o semipurificadas, se prefieren frecuentemente como cribados «primarios» que se pueden generar para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en un objetivo molecular mediada por un compuesto de ensayo. Asimismo, los efectos de la toxicidad o biodisponibilidad celular del compuesto de ensayo, generalmente se pueden ignorar en el sistema *in vitro*, centrando principalmente el ensayo en cómo el efecto del fármaco sobre el objetivo molecular se puede manifestar en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIA y activina.

A modo meramente ilustrativo, en un ensayo de cribado ejemplar, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIA aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a activina. A continuación, se añade a la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIA una composición que contiene un ligando de ActRIIA. La detección y cuantificación de complejos de ActRIIA/activina proporciona un medio de determinación de la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIA y activina. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Asimismo, se puede realizar también un ensayo de control para proporcionar una referencia comparativa. Por ejemplo, en un ensayo de control se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActRIIA y se cuantifica la formación de complejo ActRIIA/activina en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, se puede modificar el orden en que se pueden mezclar los reactivos y que estos se pueden mezclar simultáneamente. Asimismo, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para conseguir un sistema de ensayo libre de células.

La formación del complejo entre el polipéptido ActRIIA y activina se puede detectar mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como polipéptido ActRIIA o activina marcados con radioisótopos (p. ej., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcados fluorescentemente (p. ej., FITC) o marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

En ciertas realizaciones del presente documento, se contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, tanto directa como 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 onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y patente US5677196), resonancia por plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas realizaciones descritas en el presente documento.

Asimismo, se puede usar un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el «ensayo doble híbrido», para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la patente US5283317; Zervos y col. (1993) Cell 72:223-232; Madura y col. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel y col. (1993) Immunotechnology 14:920-924 y Hoogenboom y col. (1993) Oncogene 8:1693-1696). En una realización específica del presente documento, se contempla el uso de sistemas doble híbrido inversos para identificar compuestos (p. ej., moléculas pequeñas o péptidos) que disocien las interacciones entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81 y las patentes US5525490; US5955280 y US5965368.

Los compuestos objetivo pueden ser identificados por su capacidad de interacción con un polipéptido ActRIIA o de activina. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIA o de activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción se puede identificar al nivel de proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo fotoentrecruzamiento, unión a ligando marcado radioactivamente y cromatografía de afinidad (Jakoby W B y col., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos se pueden cribar en un ensayo basado en mecanismos de acción, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de activina o ActRIIA. Este puede incluir un evento de unión en fase sólida o en fase fluida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido de activina o ActRIIA se puede transfectar con un sistema reportero (p. ej., β -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y cribar frente a la biblioteca, preferentemente un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos de acción, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con el objetivo fijado a un pocillo, perla o chip, capturado mediante un anticuerpo inmovilizado o se pueden resolver mediante electroforesis capilar. Normalmente, los compuestos unidos se pueden detectar usando resonancia colorímétrica, de fluorescencia o por plasmones superficiales.

En ciertos aspectos del presente documento, se desvelan métodos y agentes para la modulación (estimulación o inhibición) de la formación de hueso y el aumento de la masa ósea. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado se puede ensayar en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización óseos. Para este propósito, se pueden utilizar diversos métodos conocidos en la

técnica. En particular, se pueden ensayar los compuestos para determinar su capacidad de aumentar el recambio óseo.

Por ejemplo, se puede determinar el efecto de los polipéptidos ActRIIA o de activina, o de los compuestos de ensayo, sobre el crecimiento de hueso o de cartílago mediante medición de la inducción de Msx2 o diferenciación de células osteoprogenitoras a osteoblastos en ensayos basados en células (véase, p. ej., Daluiski y col., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino y col., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Otro ejemplo de ensayo basado en células incluye el análisis de la actividad osteogénica de los polipéptidos ActRII o de activina y los compuestos de ensayo en células progenitoras mesenquimales y células osteoblásticas. A modo ilustrativo, se pueden generar constructos de adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido ActRIIA o de activina para infectar células progenitoras mesenquimales pluripotentes C3H10T1/2, células preosteoblásticas C2Cl2 y células osteoblásticas TE-85. A continuación, se determina la actividad osteogénica mediante medición de la inducción de la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y la mineralización de la matriz (véase, p. ej., Cheng y col., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52).

También se desvelan en el presente documento ensayos *in vivo* para medir el crecimiento de hueso y de cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai y col., Bone, 28:80-86 (2001) desvelan un modelo osteoporótico de rata en el que se estudia la reparación ósea en el periodo temprano tras la fractura. Kubo y col., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) también desvelan un modelo osteoporótico de rata en el que se estudia la reparación ósea en el periodo temprano tras la fractura. Andersson y col., J. Endocrinol. 170:529-537 describen un modelo de ratón de osteoporosis en el que los ratones se someten a ovariectomía, que provoca que los ratones pierdan un contenido mineral óseo y una densidad mineral ósea sustanciales, perdiendo el hueso trabecular aproximadamente el 50 % de densidad mineral ósea. La densidad ósea se podría aumentar en los ratones sometidos a ovariectomía mediante administración de factores tales como la hormona paratiroides. En ciertos aspectos, se pueden usar los ensayos de curación de fracturas conocidos en la técnica. Estos ensayos incluyen la técnica de fractura, el análisis histológico y el análisis biomecánico, que se describen en, por ejemplo, la patente US6521750, para su divulgación sobre protocolos experimentales para provocar fracturas, así como para medir el grado de fractura y el proceso de reparación.

25 5.4 DOSIS

En el presente documento se proporciona un inhibidor de ActRII para su uso en los métodos de tratamiento de los CKD-MBD y/o la enfermedad ósea de bajo recambio, donde los métodos comprenden la administración a un paciente que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII (véase la Sección 5.2). En ciertas realizaciones, un inhibidor de ActRII es un inhibidor de ActRIIA tal y como se expone en la Sección 5.2(a). En otras realizaciones, un inhibidor de ActRII es un inhibidor de ActRIIB tal y como se expone en la Sección 5.2(a). En ciertas realizaciones, un inhibidor de ActRII es una combinación de un inhibidor de ActRIIA y un inhibidor de ActRIIB.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es suficiente para mejorar un síntoma de los CKD-MBD. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es suficiente para evitar que empeore al menos un síntoma de los CKD-MBD.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII mejora o estabiliza la función renal. La función renal se puede medir mediante la velocidad de filtración glomerular. Véase, p. ej., la Sección 5.4(a)(iv). En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es una dosis diaria que es suficiente para estabilizar la velocidad de filtración glomerular de un paciente con CKD-MBD durante la duración del tratamiento con inhibidor de ActRII y durante al menos 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es una dosis diaria que es suficiente para aumentar la velocidad de filtración glomerular en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos un 50 %.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII aumenta el nivel de glóbulos rojos y/o los niveles de hemoglobina en el paciente.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es efectiva para (a) aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina del paciente; (b) mejorar la calidad ósea y/o la densidad mineral ósea del paciente y (c) mejorar la función renal del paciente.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es efectiva para (a) aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina del paciente; (b) mejorar el recambio óseo del paciente y (c) mejorar la función renal del paciente.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de ActRII se dosifica en intervalos y cantidades suficientes para alcanzar concentraciones en suero de 0,2 microgramos/kg o más, y niveles en suero de 1 microgramo/kg, son deseables concentraciones de 2 microgramos/kg o más para conseguir efectos significativos sobre la densidad y resistencia óseas. Los regímenes de dosificación se pueden diseñar para alcanzar concentraciones en suero de entre 0,2 y 15 microgramos/kg y, opcionalmente, de entre 1 y 5 microgramos/kg. En humanos, los niveles en suero de 0,2 microgramos/kg se pueden alcanzar con una sola dosis de 0,1 mg/kg o más y los niveles en suero de 1 microgramo/kg se pueden alcanzar con una sola dosis de 0,3 mg/kg o más. La semivida en suero observada de la molécula es de

entre aproximadamente 20 y 30 días, sustancialmente más largas que la de la mayoría de proteínas de fusión Fc y, por tanto, se puede alcanzar un nivel en suero efectivo sostenido, por ejemplo, mediante dosificación con 0,2-0,4 mg/kg semanalmente o bisemanalmente, o se pueden usar dosis más altas con intervalos más largos entre dosificaciones. Por ejemplo, se podrían usar dosis de 1-3 mg/kg mensualmente o bimensualmente, y el efecto sobre el hueso puede ser lo suficientemente duradero como para que esa dosificación sea necesaria solo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses.

5.5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

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

En ciertas realizaciones, los métodos terapéuticos descritos en el presente documento incluyen la administración de la composición sistémicamente o localmente en forma de un implante o dispositivo. Cuando se administran, las composiciones terapéuticas usadas en el presente documento pueden estar en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente a los compuestos objetivo agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de ActRIIA que, opcionalmente, también pueden ir incluidos en la composición tal y como se ha descrito anteriormente (p. ej., polipéptidos ActRII, tales como polipéptidos ActRIIA y/o ActRIIB (véase la Sección 5.2)).

Habitualmente, los antagonistas de ActRIIA se administrarán parenteralmente. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRII en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas, dispersiones, suspensiones, emulsiones o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, farmacéuticamente estables que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, agentes de suspensión o agentes espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos descritos en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma apta para su administración en un sitio de un tejido objetivo (p. ej., hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden incluir una matriz capaz de liberar uno o más compuestos terapéuticos (p. ej., polipéptidos ActRIIA) en un sitio de un tejido objetivo (p. ej., hueso) que proporciona una estructura para el tejido en desarrollo y es capaz de ser reabsorbida óptimamente en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar la liberación lenta de los polipéptidos ActRIIA. Tales matrices se pueden formar con materiales que actualmente se usan para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de la interfaz. La aplicación concreta de las composiciones objetivo definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como el colágeno óseo o dérmico. Otras matrices adicionales comprenden proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatita, biovidrio, aluminatos u otros materiales cerámicos sinterizados. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos de material anteriormente mencionados, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos pueden tener alterada su composición, tal como en el fosfato-aluminato cálcico, y se pueden procesar para alterar su tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones usadas en los métodos descritos en el presente documento se pueden administrar oralmente, p. ej., en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base saborizada, normalmente sucrosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sucrosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, contenido todas ellas una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, un electuario o una pasta.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, pastillas, grageas, polvos, gránulos y similares) se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos usados en los métodos descritos en el presente documento con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato

dicálico y/o uno de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como féculas, lactosa, sucrosa, glucosa, manitol y/o ácido salicílico; (2) ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrandes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, fécula de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) acelerantes 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) agentes colorantes. En el caso de las 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
cápsulas, comprimidos y pastillas, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes 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 concreto aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las 15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes de suspensión y emulsionantes, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

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

Las composiciones usadas en los métodos descritos en el presente documento también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sóblico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de dosificación lo determinará el médico responsable del tratamiento considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objetivo usados en los métodos descritos en el presente documento (p. ej., polipéptidos ActRII, tales como polipéptidos ActRIIA y/o ActRIIB (véase la Sección 5.2)). Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, la cantidad de peso óseo que se desea que se forme, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio del daño óseo, el estado del hueso dañado, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a la pérdida ósea, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y los tipos de compuestos de la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosificación. El progreso se puede monitorizar mediante evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación óseos, por ejemplo, mediante rayos X (incluyendo DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcado con tetraciclina.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos ActRII. Tal terapia consigue su efecto terapéutico mediante introducción de las secuencias de polinucleótidos de ActRII en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La administración de secuencias de polinucleótidos de ActRII se puede conseguir 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 de ActRII es preferible el uso de liposomas dirigidos. Los polipéptidos ActRII pueden ser polipéptidos ActRIIA y/o polipéptidos de ActRIIB (véase la Sección 5.2)).

Los diversos vectores virales que se pueden usar para terapia génica tal y como se ha enseñado en el presente documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia virus o, preferentemente, virus ARN tales como retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de forma que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de un objetivo mediante fijación de, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se puede conseguir usando un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden insertar en el genoma retroviral o fijar en una envoltura viral secuencias de polinucleótidos específicas para permitir la administración específica al objetivo del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIA. En una realización preferida, el vector

se dirige al hueso o al cartílago.

Como alternativa, se pueden transfectar directamente células de cultivo tisular con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección por el método del fosfato cálcico. A continuación, estas células son transfectadas con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de liberación dirigido para polinucleótidos de ActRIIA es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal que se puede usar es un liposoma. Los liposomas son vesículas artificiales con membrana que son útiles como vehículos de entrega in vitro e in vivo. El ARN, ADN y los viriones intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y entregar a las células en una forma biológicamente activa (véase, p. ej., Fraley y col., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981).

Los métodos efectivos de transferencia génica que usan como vehículo un liposoma se conocen en la técnica, véase, p. ej., Mannino, y col., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros lípidos u otros fosfolípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

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

6. EJEMPLOS

6.1 Ejemplo 1

(a) Proteínas de fusión ActRIIA-Fc

Se describe una proteína de fusión ActRIIA que tiene el dominio extracelular del ActRIIA humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo. Los constructos se denominan ActRIIA-hFc y mActRIIA-Fc, respectivamente. ActRIIA-hFc se proporciona como SEQ ID NO: 7. mActRIIA-Fc es el equivalente murino a la SEQ ID NO: 7.

Se expresaron las proteínas ActRIIA-hFc y mActRIIA-Fc en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

(i) Melitina de abeja melífera (HBML): SEQ ID NO: 8

(ii) Activador del plasminógeno tisular (TPA) SEQ ID NO: 9

(iii) ActRIIA nativo: SEQ ID NO: 10

La forma seleccionada emplea la líder del TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar expuesta en la SEQ ID NO: 13. Este polipéptido es codificado por la SEQ ID NO: 14.

(b) Proteínas de fusión ActRIIB-Fc

La estructura cocristalina de un dominio extracelular de ActRIIB humano fusionado a un dominio Fc y activina humanas no mostró ningún papel en la unión al ligando para los 15 aminoácidos finales (C-terminal) (denominados la «cola» en el presente documento) del dominio extracelular. Esta secuencia no se resolvió en la estructura cristalina, lo que sugiere que estos residuos están presentes en un bucle flexible que no se empaqueta uniformemente en el cristal.

Thompson y col. EMBO J. 2003 Apr 1; 22(7):1555-66. Esta secuencia también se conserva mal entre ActRIIB y ActRIIA. Por consiguiente, estos residuos se omitieron del constructo de fusión ActRIIB-Fc básico u original. Además, la posición 64 de la forma original está ocupada por una alanina, lo cual generalmente se considera la forma de «tipo salvaje», aunque hay un alelo A64R presente de forma natural. Por tanto, la fusión ActRIIB-Fc original tiene la secuencia desvelada como SEQ ID NO: 21.

Sorprendentemente, se encontró que la cola C-terminal mejora la unión a activina y GDF-11, por tanto, una versión preferida de ActRIIB-Fc tiene una secuencia de SEQ ID NO: 20.

Una variedad de variantes de ActRIIB que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se describen en la solicitud de patente internacional publicada como WO2006/012627 (véanse, p. ej., las págs. 59-60).

6.2 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE mACTRIIA EN UN MODELO DE RATÓN DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

5 Este estudio se diseñó para estudiar los efectos de ActRIIA de ratón fusionado con Fc de ratón a través de un conector mínimo (SEQ ID NO: 15) sobre el tratamiento de parámetros sanguíneos y óseos en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica y CKD-MBD.

Los pacientes con enfermedad renal crónica (CKD) pueden llegar a estar anémicos y también osteopénicos. En este modelo, se usaron ratones con ablación renal parcial (nefrectomía 5/6) como modelo de CKD para ensayar los efectos del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Se sometieron los ratones a dos cirugías para 1) extirpar un riñón por completo y 2) ligar 2 de las 3 arterias renales al riñón restante. También se incluyeron ratones operados de forma simulada como controles. La cirugía simulada y la nefrectomía 5/6 se realizaron en Jackson Laboratories.

10 Tras la recepción de los ratones, se sometieron a dieta rica en grasas durante toda la duración del estudio. Dos semanas después de la cirugía final, se dividieron los ratones en grupos (tanto SIMULADO como CKD) y se comenzó 15 a dosificar el vehículo (PBS) o mActRIIA-Fc a 10 mg/kg dos veces a la semana durante 8 semanas. Se tomaron recuentos sanguíneos completos (CBC) periódicamente durante el estudio para evaluar la presencia de anemia.

20 Se determinó la densidad mineral ósea usando absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA, PIXIMus). A la conclusión del estudio, se llevaron a cabo necropsias para recoger los huesos largos de las extremidades posteriores y los órganos principales. El riñón sobrante se envió para su procesamiento histológico y tinción con hematoxilina-eosina o tinción tricrómica. Se sometieron los fémures a uCT (Scanco) para determinar la microarquitectura ósea.

25 Los ratones parecían normales y saludables durante todo el periodo de estudio y ganaron peso a medida que el estudio progresaba (Figura 1). La densidad mineral ósea aumentó en los cuatro grupos de ratones, pero los ratones tratados con mActRIIA-Fc (SIMULADOS y CKD) tenían aumentos mayores que cualquiera de los grupos tratados con vehículo (Figura 2). El tratamiento con mActRIIA-Fc en ratones CKD obtuvo densidades minerales que igualaban o superaban a las de los rayones tratados con VEH SIMULADOS al final del estudio. Los ratones CKD se volvieron anémicos al final del estudio (HCT < 40 %), pero el tratamiento con mActRIIA-Fc evitó la anemia en el grupo CKD (HCT > 40 %; Figura 3). Los ratones tratados con mActRIIA-Fc del grupo SIMULADO también mostraron aumentos 30 de HCT en comparación con los controles VEH. El análisis micro-CT de los fémures tras la disección mostró aumentos de hueso trabecular en los ratones tratados con mActRIIA-Fc, pero no hubo diferencias importantes entre los grupos SIMULADO y CKD tratados con vehículo en este momento de la progresión de la enfermedad. En la necropsia, no se observaron diferencias importantes en el peso de los órganos, aunque los ratones tratados con mActRIIA-Fc tenían un ligero aumento del peso de las bolsas de grasa. Las secciones histológicas con tinción tricrómica del riñón sobrante no indicaron fibrosis generalizada en los ratones CKD en este punto del estudio.

35 6.3 LA INHIBICIÓN DE mACTRIIA EVITA LA ANEMIA Y LA PÉRDIDA ÓSEA EN UN MODELO TERAPÉUTICO DE ENEFERMEDAD RENAL CONSOLIDADA

40 La nefrectomía 5/6 en roedores es un protocolo experimental habitualmente realizado y usado para modelos de enfermedad renal crónica. En esta cirugía bifásica, se extirpan 2/3 de un riñón y el riñón completo del lado contralateral usando procedimientos quirúrgicos asépticos. Como resultado de la cirugía, el animal experimenta una función renal deficiente y exhibe un comportamiento patológico análogo a los humanos con enfermedad renal crónica.

45 La cirugía simulada y la nefrectomía 5/6 se realizaron en Jackson Laboratories de acuerdo con procedimientos operativos estándar. Se permitió que los animales se recuperaran de la cirugía y, a continuación, se enviaron. Los animales se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante un mínimo de 48 horas antes de realizar las primeras mediciones. Durante este periodo, se observaron todos los animales en busca de cualquier signo de anomalía clínica que los pudiera excluir del estudio. Se asignó a los animales un número de estudio en las tarjetas identificativas de sus jaulas y se identificaron de forma única mediante marcado en las orejas.

50 Se diluyó la proteína ActRIIA-mIgG2aFc usando PBS estéril hasta una concentración de 2,0 mg/ml. La concentración de dosificación fue: 2,0 mg/ml. Se almacenó la proteína ActRIIA-mIgG2aFc a -65 °C ± 15 °C, el material se puede descongelar a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. La proteína congelada se mantuvo en hielo húmedo hasta su uso.

55 Se sometieron treinta ratones hembra C57BL/6 (10 semanas de edad) a nefrectomía 5/6 en la que un riñón se extirpa completamente y, a continuación, se ligan 2 de las 3 venas renales al riñón restante dos semanas después. También se realizaron en treinta hembras C57BL/6 cirugías simuladas en las que los animales se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico abdominal, pero sin extirpación de los riñones. Después de que se recuperaran de la segunda cirugía se enviaron los animales y se permitió que se aclimataran a las condiciones de laboratorio durante un mínimo de 48 horas. Dos meses después de la segunda cirugía, se asignaron aleatoriamente los ratones a uno de los cuatro grupos de tratamiento, con 15 ratones por grupo (Tabla 2). Se pesaron los ratones y se les aplicó una dosis de

mActRIIA-Fc o PBS dos veces a la semana durante un total de 8 semanas. Se hicieron mediciones longitudinales de la densidad mineral ósea (BMD) y los parámetros hematológicos en el punto de partida, en un punto intermedio y a la conclusión del estudio. En la necropsia, se recogieron los huesos y se almacenaron para su examen histológico o análisis por micro-CT.

5 **Tabla 2:**

Grupo	N	Ratones	Dieta	Tratamiento	Cirugía	Concentración	Ruta
1	15	C57BL/6	Comida	PBS	Simulada	volumen	S.C.
2	15	C57BL/6	Comida	mActRIIA-Fc	Simulada	10 mg/kg	S.C.
3	15	C57BL/6	Comida	PBS	Nefr. 5/6	volumen	S.C.
4	15	C57BL/6	Comida	mActRIIA-Fc	Nefr. 5/6	10 mg/kg	S.C.

(a) PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

(i) Modificación quirúrgica

Se sometieron ratones hembra C57BL/6 de 10 semanas de edad a una cirugía en dos etapas para lograr una nefrectomía 5/6 o la cirugía simulada equivalente.

(ii) Dosificación a los animales

La administración de dosis en el presente estudio comenzó un mes después de la finalización de la nefrectomía 5/6. Se pesaron los ratones y se les administraron 10 mg/kg de PBS o mActRIIA-Fc dos veces a la semana mediante inyección subcutánea.

15 (iii) Densitometría ósea DXA

Se realizaron mediciones longitudinales de BMD mensualmente mediante densitometría ósea DXA (Lunar PIXIMus, GE Medical Systems) a ratones anestesiados. Durante los análisis de BMD por DXA se eliminó la cabeza del ratón de la región de interés evitar los aparatos de cuantificación asociados al cráneo.

(iv) Toma de muestras de sangre

20 Se realizaron mediciones longitudinales de recuentos sanguíneos completos (HM2, VetScan) en sangre recogida mensualmente mediante extracción submandibular. Al final del estudio se realizó una extracción terminal, se recogió la sangre y se dividió en un tubo que contenía EDTA para su análisis CBC o en un tubo de separación de suero para la toma de muestras de suero. El suero se congeló a -80 °C para su análisis futuro.

(v) Análisis del suero

25 El suero congelado se descongeló y se analizaron 100 microlitros usando un analizador Vetscan VS2 (Abaxis, Inc.). Se uso un rotor diagnóstico integral para analizar las muestras y determinar la albúmina sérica (ALB), la fosfatasa alcalina (ALP), la alanina aminotransferasa (ALT), la amilasa (AMY), bilirrubina total (TBIL), el nitrógeno ureico en sangre (BUN), el calcio total (Ca++), el fósforo (PHOS), la creatinina (CRE), la glucosa (GLU), el sodio (NA+), el potasio (K+), la proteína total (TP) y la globulina (GLOB).

30 (vi) Necropsia

A la finalización de estudio, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂. Se extirparon los riñones y bazos, se pesaron y se almacenaron en formalina al 10 %. Se recogieron las tibias y fémures y se almacenaron en etanol al 70 %.

(vii) Análisis por micro-CT

35 Al final del experimento, se diseccionaron el fémur y tibia izquierdos de cada ratón y se fijaron en etanol al 70 %. Se sometieron los huesos a micro-CT usando un dispositivo Scanco (VivaCT75, Scanco) a 55 kV, 145 microA y un tamaño de voxel de 20 micrómetros. Las imágenes obtenidas se reconstruyeron usando el software de Scanco incorporado. Se evaluó el volumen de hueso trabecular (BV/TV) y el espesor trabecular (TbTh) en una sección de 400 micrómetros de hueso que estaba ubicada a 200 micrómetros del extremo distal del fémur. Se midió el espesor cortical en una sección de 200 micrómetros de hueso centrada en la línea media del fémur.

(viii) ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron comparaciones entre los ratones y tejidos tratados con mActRIIA-Fc y con vehículo mediante la prueba t de Student usando Microsoft Excel. Los datos se expresaron como media ± SEM.

(b) Resultados

5 Investigamos la capacidad de mActRIIA-Fc para evitar la anemia y la pérdida ósea en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica. Después de 2 meses de progresión de la enfermedad siguientes a la nefrectomía 5/6 (Día 0), los ratones sometidos a nefrectomía 5/6 (CKD) exhibieron una reducción significativa del hematocrito en comparación con las cohortes simuladas (-5,4 %, P<0,01). La toma de muestras de sangre longitudinal y su posterior análisis CBC mostraron que los ratones tratados con mActRIIA-Fc, tanto en la cohorte simulada como en la CKD, mostraban aumentos significativos del hematocrito en comparación con sus equivalentes tratados con VEH después de 4 y 8 semanas de tratamiento (Figura 5).

Después de 2 meses de progresión de la enfermedad siguientes a la nefrectomía 5/6 (Día 0), los ratones sometidos a nefrectomía 5/6 (CKD) exhibieron una reducción significativa de la BMD en comparación con las cohortes simuladas (-5,4 %, P<0,01). A lo largo de 6 semanas de tratamiento, las cohortes simulada y CKD tratadas con mActRIIA-Fc tenían una BMD significativamente mayor que la de sus equivalentes tratados con VEH (Figura 6).

15 A la finalización del estudio, se recogieron las extremidades posteriores y se fijaron en etanol al 70 %. El fémur derecho se sometió a micro-CT (VivaCT 75, Scanco) para cuantificar la estructura ósea cortical y trabecular. La Figura 7 muestra imágenes de secciones transversales de fémures de cada grupo de tratamiento. Los ratones nefrectomizados exhibían menor espesor cortical y no presentaban cambios obvios en la estructura del hueso trabecular.

20 Los ratones tratados con mActRIIA-Fc exhibían aumento tanto del espesor cortical como del volumen de hueso trabecular. Se usaron análisis de la diáfisis media del fémur para cuantificar el espesor cortical medio en cada cohorte (Figura 8). Los ratones CKD presentaban huesos corticales más finos que sus equivalentes simulados en ambas cohortes, VEH (P<0,01) y mActRIIA-Fc (P<0,01). Los ratones tratados con mActRIIA-Fc presentaban un aumento significativo de hueso cortical en ambas cohortes, simulada (+17 %, P<0,01) y CKD (+19,2 %, P<0,01), en comparación con los respectivos ratones tratados con VEH. Tal como evidencian las imágenes de las muestras de la

25 Figura 7, los análisis del fémur distal revelaron aumentos drásticos del volumen y espesor de hueso trabecular en los ratones tratados con mActRIIA-Fc. mActRIIA-Fc fue capaz de aumentar significativamente el volumen de hueso trabecular (Figura 9) y el espesor trabecular (Figura 10) con respecto a los ratones tratados con VEH en ambas cohortes, simulada y CKD. En la semana 8, las mediciones del volumen de hueso trabecular demostraron que los ratones tratados con mActRIIA-Fc presentaban un aumento significativo del volumen de hueso trabecular en ambas cohortes, simulada (+549 %, P<0,001) y CKD (+827 %, P<0,001), en comparación con los respectivos ratones tratados con VEH. En la semana 8, las mediciones del espesor trabecular demostraron que los ratones tratados con mActRIIA-Fc presentaban un aumento significativo del espesor trabecular en las cohortes CKD (+62 %, P<0,001) en comparación con los respectivos ratones tratados con VEH.

30 35 En el momento del sacrificio final, se tomó sangre entera de todos los animales y se procesó para obtener suero. Las muestras de suero se analizaron usando un analizador Vetscan VS2 (Abaxis, Inc) usando un rotor de perfil integral. Los valores medios de los analitos de cada grupo se muestran en la Tabla 3. La comparación de los grupos de control SIMULADO y CKD, mostró los aumentos de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina (CRE) esperados a causa de la función renal deficiente. Además, la ALT y la amilasa (AMY) aumentaron en los ratones CKD debido a la alteración de la función renal o como indicativo de que la nefrectomía también altera la función del hígado. Los niveles de calcio (CA++) y fosfatases alcalinas totales (ALP) también aumentaron según lo esperado debido al aumento de recambio óseo. El tratamiento con mActRIIA-Fc aumentó los niveles de ALP tanto en los ratones SIMULADOS como en los CKD debido a las propiedades anabólicas óseas del fármaco. En los ratones CKD, el tratamiento con mActRIIA-Fc redujo los niveles de albúmina (ALB), proteína total (TP) y CRE en comparación con los controles CKD-VEH, pero no fueron diferentes de los de los ratones SIMULADOS. No se cree que estos cambios sean relevantes para el modelo o tratamiento en este punto.

Tabla 3

		VEH SIMULADO	mActRIIA-Fc SIMULADO	CKD VEH	CKD mActRIIA-Fc
AMY	U/L	865,45 ± 39,41	803,38 ± 66,06	1486,18 ± 53,82	1418,42 ± 36,68
TBIL	mg/dL	0,25 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,01
BUN	mg/dL	27,92 ± 1,39	29,20 ± 1,26	52,75 ± 2,66	51,50 ± 2,10
CA ₊₊	mg/dL	10,18 ± 0,16	10,38 ± 0,12	11,00 ± 13	11,33 ± 0,13
PHOS	mg/dL	8,58 ± 0,17	8,96 ± 0,28	8,28 ± 0,36	7,96 ± 0,26

CRE	mg/dL	0,33 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,31 ± 0,02 ^a
GLU	mg/dL	198,50 ± 6,52	260,90 ± 28,79*	223,67 ± 13,53	260,86 ± 14,98
NA ₊	mmol/L	156,50 ± 0,77	157,60 ± 0,73	158,58 ± 2,37	155,64 ± 0,34
K ₊	mmol/L	7,65 ± 0,14	7,85 ± 0,15	7,98 ± 0,14	7,77 ± 0,13
TP	g/dL	5,66 ± 0,05	5,42 ± 0,057*	5,73 ± 0,08	5,47 ± 0,07 ^a
GLOB	g/dL	1,79 ± 0,08	1,67 ± 0,06	1,73 ± 0,07	1,97 ± 0,06 ^a
[*] = p<0,05 frente a SIMULADO VEH; ++ = p<0,05 frente a CKD VEH					

(c) CONCLUSIONES

El tratamiento con mActRIIA-Fc fue capaz de evitar la anemia y la pérdida ósea en un modelo de nefrectomía 5/6 de enfermedad renal crónica. Los ratones CKD estaban anémicos, presentaban menor BMD y una estructura ósea

- 5 cortical más fina en el fémur que sus equivalentes SIMULADOS. El tratamiento con mActRIIA-Fc de ratones CKD aumentó el hematocrito, la BMD y la estructura ósea cortical significativamente con respecto a los ratones tratados con VEH. Asimismo, mActRIIA-Fc fue capaz de aumentar el volumen de hueso trabecular y el espesor trabecular en los ratones CKD a valores superiores a los de los ratones tratados con VEH en ambas cohortes, simulada y CKD. Estos datos demuestran que el bloqueo de la señalización del receptor IIA de activina mediante administración de 10 mActRIIA-FC puede evitar la anemia y la pérdida ósea en un modelo de nefrectomía 5/6 de enfermedad renal crónica.

6.4 EJEMPLO PROFÉTICO DE INHIBICIÓN DE mACTRIIA PARA TRATAR LA ENFERMEDAD ÓSEA ADINÁMICA EN EL CONTEXTO DE LA CKD

Los ratones se sometieron a electrocauterización de un riñón y nefrectomía del otro riñón. Los ratones se alimentan con comida pobre en fosfato suplementada con calcitriol. Véase, *p. ej.*, Lund y col., 2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369.

Este estudio está diseñado para estudiar los efectos de ActRIIA soluble de ratón fusionado con Fc de ratón a través de un conector mínimo (SEQ ID NO: 15) sobre el tratamiento de parámetros sanguíneos y óseos en un modelo de ratón de enfermedad ósea adinámica.

20 Se usan ratones con electrocauterización de un riñón y nefrectomía del otro riñón como modelo de hueso adinámico en el contexto de la CKD («ADB») para ensayar los efectos del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 en este modelo. Se someten los ratones a dos cirugías para 1) extirpar un riñón por completo y 2) electrocauterizar el otro riñón. También se incluyen ratones operados de forma simulada como controles. Las cirugías se pueden llevar a cabo tal y como se describe en Lund y col., 2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369.

25 Un grupo de ratones se somete a dieta alimenticia baja en fosfato suplementada con calcitriol. Otro grupo de ratones se somete a dieta alimenticia normal. Dos semanas después de la cirugía final, se dividen los ratones en grupos (tanto SIMULADO como ADB) y se comienza a administrar vehículo (PBS) o mActRIIA-Fc a 10 mg/kg dos veces a la semana durante 8 semanas. Se toman recuentos sanguíneos completos (CBC) periódicamente durante el estudio para evaluar la presencia de anemia.

30 Se determina la densidad mineral ósea usando absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA, PIXIMus). A la conclusión del estudio, se llevan a cabo necropsias para recoger los huesos largos de las extremidades posteriores y los órganos principales. El riñón sobrante se envía para su procesamiento histológico y tinción con hematoxilina-eosina o tinción tricrómica. Se someten los fémures a uCT (Scanco) para determinar la microarquitectura ósea. También se puede usar la tomografía computerizada cuantitativa (QCT) para determinar el recambio óseo.

6.5 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE ACTRIIA SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

35 Este ejemplo demuestra que la inhibición de ActRIIA es efectiva en la reducción de los niveles de calcio en la vasculatura de los sujetos y, por tanto, representa un medio de tratamiento de la calcificación vascular.

Se indujo enfermedad renal crónica (CKD) en etapa 3 a ratones *ldlr*^{-/-} de 14 semanas de edad (C57B1/6J original; Jackson Laboratory) alimentados con dietas ricas en grasa («ratones CKD»). Se sabe que el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*ldlr*) está implicado en la eliminación de lípidos y los ratones transgénicos *ldlr* representan un modelo 40 de aterosclerosis. Los ratones deficientes en *ldlr* alimentados con dietas ricas en grasa/colesterol desarrollan aterosclerosis y placas aórticas asociadas a la calcificación estimulada por la CKD inducida mediante ablación renal. Se indujo CKD en los ratones *ldlr*^{-/-} mediante nefrectomía 5/6 (véase arriba). Tal y como se ha descrito anteriormente, la nefrectomía 5/6 comprende la extirpación completa de un riñón seguida de ligación de 2 de las 3 venas renales en

el riñón restante.

En la semana 22, se consolidó la calcificación vascular en los ratones CKD, tal y como se confirmó mediante cuantificación química de la calcificación. En resumen, se diseccionaron los corazones y aortas de los ratones en el momento del sacrificio y se eliminó todo el tejido extraño mediante disección roma bajo un microscopio de disección.

5 Se desecaron los tejidos durante 20-24 horas a 55 °C, se pesaron y se pulverizaron con un mortero. Se eluyó calcio en ácido fórmico al 10 % (10:1 v/p) durante 24 horas a 4 °C. Se ensayó el contenido de calcio del eluido usando un método cresolftaleína complexona (Sigma, St Louis), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se corrigieron los resultados para el peso de tejido seco.

10 Se dividieron los ratones CKD en dos grupos experimentales (i) ratones tratados con mActRIIA-Fc y (ii) ratones CKD-3-Vehículo, a los que se administró solo la porción de vehículo de la composición mActRIIA-Fc (es decir, se administró a los ratones una composición salina sin mActRIIA-Fc). A los ratones tratados con mActRIIA-Fc (n = 5) se les administraron 10 mg/kg de mActRIIA-Fc dos veces a la semana durante 6 semanas. A los ratones CKD-3-Vehículo (n = 6; vehículo = solución salina) se les administró solo vehículo en los mismos días que se administraba mActRIIA-Fc a los ratones tratados con mActRIIA-Fc. Los ratones de tipo salvaje (n = 6; C57B1/6J original) y los ratones 15 SIMULADOS (n = 8; C57B1/6J original) se usaron como controles negativos. Los ratones SIMULADOS consistían en ratones *ldlr^{-/-}* que fueron operados pero no se les indujo CKD (p. ej., no se llevó a cabo la nefrectomía). Todos los ratones fueron sacrificados en la semana 28 para evaluación de los niveles de calcio aórtico en cada uno de los cuatro grupos de tratamiento (CKD-3-Vehículo; tratados con mActRIIA-Fc; SIMULADOS y tipo salvaje).

20 La Tabla 4, que se muestra a continuación, presenta los niveles de calcio aórtico observados en cada ratón usado en el estudio (columna 2), así como los niveles de calcio promedio de cada uno de los grupos de estudio SIMULADO, CKD-3-Vehículo, mActRIIA-Fc y tipo salvaje (columna 3). Los resultados se presentan de forma gráfica en la Figura 11. Tal y como demuestran los datos, se observó una clara reducción del calcio aórtico en los ratones pertenecientes al grupo tratado con mActRIIA-Fc en comparación con el grupo tratado con vehículo. En 4 de los 5 ratones CKD que fueron tratados con mActRIIA-Fc, los niveles de calcio aórtico eran comparables a los niveles observados en los dos 25 grupos de control negativo (ratones tipo salvaje y SIMULADOS).

Se sabe que los niveles de calcio vascular (p. ej., arterial) elevados están asociados a la calcificación vascular (véase, p. ej., Raggi P y col., Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3: 836-843). Por tanto, los resultados anteriores indican que la inhibición de ActRIIA representa una estrategia adecuada para el tratamiento y la prevención de la calcificación vascular.

30 **Tabla 4: Niveles de calcio aórtico**

Grupo experimental	Niveles de Ca ²⁺ específicos del sujeto (mg/g)	Ca ²⁺ promedio en mg/g
Tipo salvaje (n = 6)	0,25; 0,11; 0,26; 0,36; 0,31; 0,35	0,27 ± 0,09
Simulado (n = 8)	0,28; 0,18; 0,24; 0,16; 0,13; 0,25; 0,26; 0,27	0,22 ± 0,06
CKD-3-Vehículo (n = 6)	0,58; 0,17; 0,51; 0,56; 0,31; 0,99	0,52 ± 0,28
mActRIIA-Fc (n = 5)	0,83; 0,28; 0,19; 0,13; 0,04	0,29 ± 0,31

6.6 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE ACTRIIA SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

Este ejemplo describe un estudio del efecto de la inhibición de ActRII sobre la calcificación vascular en sujetos con enfermedad renal crónica.

35 Se puede usar el modelo de CKD-MBD precoz descrito en los ejemplos anteriores. En este modelo, se añade la ablación renal a la deficiencia genética del receptor de LDL, *ldlr*, y se alimentan los ratones con una dieta rica en grasa y colesterol. En la CKD en etapa 3, los animales presentan estimulación de la calcificación vascular inducida por la CKD, disminución de la formación ósea, niveles de FGF23 elevados, hiperfosfatemia y niveles de PTH elevados.

(a) Materiales y métodos

40 **Animales y dietas:** Se pueden adquirir ratones con deficiencia del receptor de LDL (*LDLR^{-/-}*) a partir de ratones C57B1/6J originales o C57B1/6J tipo salvaje en Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) y alimentar en un ambiente libre de patógenos. Los animales se pueden destetar a las tres semanas y pasar a una dieta alimenticia con 6,75 % de calorías en forma de grasa. A las 10 semanas se puede iniciar una dieta rica en colesterol (0,15 %) que contiene un 42 % de calorías en forma de grasa (Harlan Teklad, Madison WI, n.º de producto TD88137), una dieta que ha mostrado generar aterosclerosis con calcificación vascular en este contexto genético (véase, p. ej., Towler y col., 1998,

J Biol Chem 273:30427-30434). El contenido de calcio en todas las dietas puede ser del 0,6 %. Se puede permitir que los animales consuman agua a voluntad y se mantienen de acuerdo con las directrices de cuidado animal nacionales y locales. Se les puede administrar mActRIIA-Fc por vía IP (10 mg/kg) dos veces a la semana.

Procedimientos quirúrgicos: Se puede utilizar un procedimiento en dos etapas para provocar CKD tal y como se ha descrito anteriormente (véase, p. ej., Davies y col., 2003, J Am Soc Nephrol 14:1559-1567 y Davies y col., 2005, J Am Soc Nephrol 16:917-928). En resumen, se puede aplicar electrocauterización al riñón derecho a través de una incisión de 2 cm en el costado a las 10 semanas de su nacimiento seguida de nefrectomía total izquierda a través de una incisión similar 2 semanas después. Los animales control pueden someterse a operaciones simuladas en las que se expone y moviliza el riñón apropiado, pero no se trata de ninguna otra forma. Se puede usar anestesia intraperitoneal

(13 mg/kg de xilazina y 87 mg/kg de ketamina) para todos los procedimientos. Se pueden tomar muestras de sangre de la vena safena en la semana 1 posterior a la segunda cirugía para evaluar el punto de referencia para la función renal posquirúrgica. Se pueden sacrificar los animales bajo anestesia a las 20 semanas o 26 semanas, dependiendo del grupo, después de que se haya extraído la sangre mediante punción intracardiaca. El corazón y la aorta se pueden diseccionar en bloque.

Preparación tisular: Los animales reseccionados de pueden fijar en formalina y, a continuación, dividir como se indica a continuación: el corazón, la aorta ascendente y el arco aórtico se pueden separar de la aorta descendente y bisecionar sagitalmente a través del tracto de salida de la aorta. La aorta descendente se puede bisecionar coronalmente, aproximadamente a la mitad de su longitud. Los cuatro trozos se pueden integrar en el mismo bloque de cera. Se pueden realizar cortes (de 5 µm de espesor) y someter a tinción con hematoxilina-eosina, tricrómica, con rojo de alizarina y de von Kossa.

Inmunohistoquímica: Las secciones de tejido se pueden preparar como se ha indicado anteriormente, desparafinizar en xileno y rehidratar en etanoles graduados. Se puede bloquear la actividad peroxidasa endógena mediante incubación en peróxido de hidrógeno al 3 % (Sigma, St Louis MO) y se puede bloquear la unión inespecífica mediante incubación durante 10 minutos con una solución de caseína en PBS ('Background SNIPER', propiedad de BioCare Medical, Walnut Creek CA). La recuperación del antígeno se puede realizar mediante incubación durante 5 minutos en tampón citrato ('Decloaker' BioCare Medical, Walnut Creek CA) a 100 °C. Las secciones se pueden incubar con anticuerpo políclonal de cabra purificado por afinidad contra osteocalcina de ratón (OC) (Biogenesis Inc, Brentwood NH) durante la noche y, a continuación, incubar con anticuerpo secundario de ratón anti-cabra biotinilado durante 10 minutos antes de la tinción con peroxidasa conjugada con estreptavidina (todos los reactivos, BioCare Medical, Walnut Creek CA) y contrateñir con hematoxilina al 0,1 % (Sigma).

RT-PCR: Se puede extraer ARN de las muestras de tejido usando el kit RNAqueous-4PCR (Ambion), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se puede realizar la RT-PCR usando el kit One-step RT-PCR (Qiagen, Valencia CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones pueden ser: 50 °C durante 30 min, 95 °C durante 15 min, a continuación, 35-40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min y, a continuación, 72 °C durante 10 min. Se puede seleccionar un cebador específico de la osteocalcina murina y la GAPDH murina.

Cuantificación química de la calcificación: Los corazones y aortas se pueden diseccionar en el momento del sacrificio y eliminar todo el tejido extraño mediante disección roma bajo un microscopio de disección. Los tejidos se pueden desecar durante 20-24 horas a 55 °C, pesar y pulverizar con un mortero. Se puede eluir calcio en ácido fórmico al 10 % (10:1 v/p) durante 24 horas a 4 °C. El contenido de calcio del eluido se puede ensayar usando un método cresoltaleína complexona (Sigma, St Louis), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los resultados se pueden corregir para el peso de tejido seco.

Histomorfometría ósea: Se puede determinar la velocidad de formación de hueso mediante doble marcado fluorescente. Todos los ratones pueden recibir calceína por vía intraperitoneal (20 mg/kg) durante 7 d y sacrificarse 2 d después. En el momento en que se sacrifican los animales, se pueden diseccionar todos los fémures y colocarse en etanol al 70 %. Los especímenes se pueden implantar sin descalcificar en un kit de integración plástico H7000 (Energy Beam Sciences). Se pueden seccionar los huesos longitudinalmente a través del plano frontal en secciones de 10 µm con un micrótomo JB-4 (Energy Beam Sciences). Las secciones sin teñir se pueden usar para análisis mediante fluorescencia con marcado por calceína. Los portaobjetos se pueden examinar con una magnificación de 400X con un microscopio Leitz unido a un analizador de imágenes Osteomeasure (Osteometrics, Atlanta GA). Se pueden examinar diez campos contiguos de 0,0225 mm² del fémur distal, 150 µm proximales la placa de crecimiento, por animal.

Mediciones de hormona paratiroidea y química sérica: Se pueden obtener muestras de sangre a las 2 y 8 semanas de CKD mediante aspiración con tubo capilar de la vena safena y con un procedimiento diferente (punción intracardiaca) en el momento del sacrificio (12 semanas de CKD) y transferir a tubos heparinizados. Tras la centrifugación (a 400X g durante 5 minutos), se puede retirar el plasma, dividir en alícuotas y congelar a -80 °C. Los niveles de PTH intacta se pueden medir (mediciones solo en el momento del sacrificio debido al volumen de sangre requerido) mediante ensayo inmunoradiométrico de doble sitio (IRMA) usando un kit disponible en el mercado (Immutopics, San Clemente, CA). El nitrógeno ureico en sangre (BUN) y el calcio y fósforo en suero se pueden medir usando técnicas de análisis multicanal estándar.

Mediciones de FGF23: Se puede adquirir un ensayo ELISA para FGF23 murina de la empresa Kainos.

Mediciones de DKK1 y osteocalcina: Se pueden usar ensayos ELISA comerciales para DKK1 y osteocalcina infracarboxilada.

Mediciones de OPG y sRANKL: La proporción de OPG a RANKL se puede determinar en ensayos séricos. Estos ensayos han mostrado una buena correlación con el recambio óseo y la resorción ósea excesiva (véase, p. ej., Geusens y col., 2006, *Arthritis & Rheumatism* 54:1772-17775). Los niveles de sRANKL en el suero se pueden determinar mediante un radioinmunoensayo (Linco Research, St. Louis MO). Los niveles de OPG en el suero se pueden medir mediante un método ELISA (OSTEOmedical NL, Marishof, NL). Los coeficientes de variación (CV) intrae interensayo son inferiores al 10 % para ambos ensayos según los fabricantes. El límite de detección para sRANKL es de 0,08 pmol/l y para OPG es de 0,14 pmol/l.

Mediciones de marcadores de recambio óseo: El P1Np y la osteocalcina séricos se pueden usar como marcadores de actividad osteoblástica y la forma de fosfatasa ácida tartrato-resistente 5b (TRACP 5b) (mouseTRAP, IDS Ltd, Bolden, UK) se puede usar como marcador de los niveles osteoclásticos.

Mediciones de marcadores de inflamación: Los ensayos séricos de TNF alfa y proteína C reactiva se pueden usar para realizar un seguimiento de los niveles de inflamación y de la respuesta a mActRIIA-Fc.

Análisis estadístico: Los datos se pueden analizar para determinar su importancia estadística ($P<.05$) usando ANOVA. La comparación se puede hacer entre animales tratados con vehículo (grupo de control) y los tratados con mActRIIA-Fc. La comparación también se puede hacer entre ratones operados de forma simulada y ratones CKD tratados con vehículo y mActRIIA-Fc. Estos análisis se pueden realizar con el paquete estadístico SPSS 11.0 (Needham Heights, MA).

(b) Parámetros del estudio

Los ratones usados en el estudio se pueden colocar en uno de los ocho grupos, tal y como se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

Grupo	Descripción del grupo	N.º de animales
A	Tipo salvaje	10
B	LDLR Rica en grasa/CKD tratados con vehículo, eut. 22 sem.	10
C	LDLR Rica en grasa/CKD tratados con RAP-011, eut. 22 sem.	10
D	LDLR Rica en grasa/CKD tratados con vehículo, eut. 28 sem.	10
E	LDLR Rica en grasa/CKD tratados con RAP-011, eut. 28 sem.	10
F	LDLR Rica en grasa/operación simulada, eut. 28 sem.	10
G	LDLR Rica en grasa/operación simulada, eut. 20 sem.	10
H	LDLR Rica en grasa/CKD, eut. a las 14 semanas	10

Un grupo de animales (Grupo H de la Tabla 5) se puede sacrificar a las 14 semanas para medir la calcificación vascular y la histomorfometría de referencia en el momento de establecer la terapia. Los grupos C y E se pueden usar para evaluar la eficacia del tratamiento con mActRIIA-Fc en comparación con los grupos tratados con vehículo (grupos B y D) a lo largo de períodos variables de CKD. Los grupos F y G son animales de la misma edad alimentados con dieta rica en grasa y operados de forma simulada que se pueden usar como control para los efectos de la CKD. Los tamaños de grupo de 10 animales por grupo tras su aleatorización en los grupos de tratamiento pueden ser suficiente para obtener importancia estadística.

A las 16-18 semanas, se puede medir la velocidad de filtración glomerular (GFR) mediante inyección de inulina al ratón y medición de su desaparición. En la eutanasia, se puede extraer sangre mediante punción intracardíaca y se pueden determinar los niveles de DKK1, FGF23, osteocalcina, PTH y calcitriol, junto con los niveles de calcio sérico, Pi, nitrógeno ureico en sangre (BUN), galactosa y colesterol.

Se pueden analizar las aortas de los animales *ldlr*-/- CKD alimentados con dieta rica en grasa. Se pueden obtener los niveles de calcio aórtico total y las secciones microscópicas con tinción de von Kossa. Las aortas se pueden procesar para obtener ARN para análisis de la expresión génica aórtica. Las aortas se pueden procesar para

inmunohistoquímica. A las 22 semanas, en el modelo de CKD descrito anteriormente, la edad de eutanasia para los grupos B y C, la calcificación vascular se consolida y la enfermedad ósea adinámica está presente a pesar del hiperparatiroidismo secundario. Entre las 22 y 28 semanas, la calcificación vascular es progresiva y los efectos de la presencia de hormona paratiroidea comienzan a aumentar las superficies osteoblásticas.

- 5 El estudio descrito en este ejemplo se puede usar para determinar los efectos de la inhibición de ActRIIA sobre la calcificación vascular, las velocidades de remodelación ósea y el hiperparatiroidismo observados en sujetos con CKD.

Tabla 6: Información de las secuencias

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	Polipéptido precursor de ActRIIA humano	MGAAAKLAFAVFLISCGSAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPVVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWSQNEYEVSLPGMKHENILQFI GAEKRGTTSVDVLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGLALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVWELASRCTAADGPVDEYMLPFEETIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVLRDYWQKHAGMAML CETIEECWDHDAEARLSAGCGERITQMQLTNIITTEDIVTVTM VTNVDFPPKESSL
2	Secuencia de polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular) procesado	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM EVTQPTSNPVTPKPP
3	Secuencia de polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM
4	Secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIA humano	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTGCCGTCTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTCTTAATGCTAATTGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAGATAAACGGCGCATGGTCTACCTGGAAAGAATATTCTGGTCCATTGAAATAGTGAACAAAGGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAAATGAAAAGTTTCTTATTTCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACCTCAAATCCAGTTACACCTAACGCACCCATTACACATCCTGCTCTATTCTTGGTGCACCTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCTATTGTGCATTGGTGTACAGGCATCACAGATGGCTAACCCCTCCTGTACTTCCAACCTCAAGACCCAGGACCACCCCCACCTT
		CTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGGGAAAGATTGGTTGTCTGGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTACAGTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCTGGCAGAAAAGGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTATGTGGTCTCTGGAAATGAACGTGTCTATTGAGAACATGGCTAGAGGATTGCGATATTACATGAGGATATACTGGCCTAAAGATGGCCACAAACCTGCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAATGTGCTGTGAAAACAAACCTGCTGACAGCTGCTGACTTGGGTTGGCCTTAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATAAACCTTCGAAAGGGATGCATTGGAGATAGATATGTATGCCATTGGATTAGTCCTATGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGAGATGGACCTGTAGATGAATACTGGCATTGGAGAATGGCAATGCTCTGTGAAATTGCCAGCATCCATCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGGTGTGCAATGGCAATGCTGTGAAAGGGCTGTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAGCCAGGTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTACACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGTTGACAAATGTTGACTTCCCTCCAAAGAATCTAGTCTATGA

5	Secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular)	ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTCTTAATGCTAATTG GAAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACA AAGATAAACGGCGGCATTGTTCTACTGGAAGAATATTCTGGTTCC ATTGAAATAGTGAACAAAGGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATACTTGT GCTGTGAGGGCAATATGTGTAAATGAAAAGTTCTATTTCCAGAGATG GAAGTCACACAGCCCACCTCAAATCCAGTTACACCTAACGCCACCC
6	un dominio Fc	THTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHE DPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*
7	Dominio extracelular de	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRCFATWKNISGS
	ActRIIA humano fusionado a un dominio Fc humano	IEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM EVTQPTSNPVTPKPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	Secuencia líder de melitina de abeja melífera (HBML)	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
9	Secuencia líder de activador del plasminógeno tisular (TPA)	MDAMKRLGLCCVLLCGAVFVSP
10	Líder de ActRIIA nativo	MGAAAKLAFAVFLISCSSGA
11	Secuencia N-terminal de ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc	ILGRSETQE
12	Proteína ActRIIA con delección de los 15 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular de	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM TGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDITLMIISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia líder de TPA	MDAMKRLGLCCVLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQ GVEPCYGDKDKRRCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKK DSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPTGGGTHTCPP CPAPELLGGPSVLFPPPKDITLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

14	Secuencia de ácido nucleico que codifica ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia líder de TPA	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGCTGCTGTGGAGC AGTCTTCGTTCGCCGGCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGG AGTGTCTTTTTAATGCTAATTGGAAAAGACAGAACCAATCAAAC TG GTGTTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGCATGTTTG CT ACCTGGAAGAATATTCTGGTTCATTGAATAGTGAACAGGACTGATTGTGAGAAAAAGA CAGCCCTGAAGTATAATTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAA AGT'TTTCT'ATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCAC'TCAAATCCA GTTACACCTAACGCCACCCACCGGTGGTGAACTCACACATGCCACC GTG CCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCCAA AACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAG GTCAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGG GTAAATGAGAATT
15	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 4 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-130 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación	ETRECIYYNANWELETNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP
	L79D	
16	Secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	MTAPWVALALLWGSLW PGSGRGEAETRECIYY NANWELETNQSGLER CEGEQDKRLHCYASWA NSSGTIELVKKGWCWL DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPETYEP PPTAPTLTTLVLA YSLL PIGGLSLIVLLAFW MY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSTIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGЛАVRFE PGKPP GDTHGQVGTRRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRC KAADGPVDEYMLPFE EIGQHPSLEELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKHP GLAQLCVTIEECDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVDLPPKESSI
17	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 16)	SGRGEAETRECIYYNANWELETNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGWCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPP TAPT

18	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales (aminoácidos 19-119 de la SEQ ID NO: 16)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
19	Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB (A64) humano	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTGCCCTCCTGGGGATCGCTGTGGCC CGGCTCTGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACG CCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCCTGGAGCGCTGC GGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCTGGGCCAACAGCTC TGGCACCATCGAGCTCGTAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT GCTACGATAAGCAGGAGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTAC TTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCC
		AGAGGCTGGGGCCCGAAGTCACGTACAGAGCCACCCCCGACAGCCCCA CCCTGCTCACGGTGTGGCTACTCACTGCTGCCATCGGGGCTTTCC CTCATCGTCTGTGGCTTGGCTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTA CGGTATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCCTCACCACCATCCCCCTC TGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAAGCTGCTGGAGATCAAGGCTGGGGCGC TTTGGCTGTGTGGAAAGGCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAA GATCTTCCCCTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCT TCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTACAGTTCAATTGCTGCC GAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTT CCATGACAAGGGCTCCCTACGGATTACTCAAGGGGAACATCATCACAT GGAACGAACGTGTGTAGCAGAGACATGTACAGGCTCTCATAC CTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCAGGGCCACAAGCCGTCTAT TGCCCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCA CAGCCGTGTGGCTGACTTGCTGGCTTGTGCTGTTGAGCCAGGGAAA CCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCC TGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCA TTGACATGTATGCCATGGGTTGGTGTGGAGCTTGTGTCTCGCTGC AAGGCTGAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGA GATTGGCCAGCACCCCTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACA AGAAGATGAGGCCACCATTAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCTG GCCAGCTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGC TCGCTTGTCCGGGGCTGTGTGGAGGAGGGGTGCTCTGATTGGAGGT CGGTCAACGGCACTACCTGGACTGTCTCGTTCCCTGGTGAACCTCTGTC ACCAATGTGGACCTGCCCTAAAGAGTCAGCATCTAA
20	Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64; SEQ ID NO: 17) fusionado a un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAFTGGHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLM SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGV E VHN AKTPREEQYNSTYRV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG
21	Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGGTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
	ActRIIB (A64) con delección de los 15 aminoácidos C-terminales (SEQ ID NO: 18) fusionado a un dominio Fc	EDPEVVKFNWYDGVEVHN AKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

22	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 5 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-129 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPP
23	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPPT
24	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28), con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA	MDAMKRGILCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPPTGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
25	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCGWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

	(aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	
26	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPT
27	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales (aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 16)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
28	Secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano (R64)	MTAPWVALALLWGSIW PGSGRGEAETRECIYY NANWELERTNQSGLER CEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTVEP PPTAPTLITVLAYSL PIGGLSLIVLLAFWMY RHRKPPYGHVDIHEPD GPPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSTIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGЛАVRFEPKPP GDTHGQVGTRRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRCAAADGPVDEYMLPFE EIGQHPSLEELQEVV HKKMRPTIKDHWLKHP GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRR SVNGTTSDCLVSL VTSVTNVDLPPKESSI
29	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 28)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPT
30	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales (aminoácidos 19-119 de la SEQ ID NO: 28)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
31	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPT

	NO: 28)	
32	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
	con delección de los 15 aminoácidos C-terminales (aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 28)	
33	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELV KKGCWDDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPPT
34	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16), con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSGLERC EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFN CYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGGTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
35	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK KGCGWDDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
	y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16) y con una	WLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

	mutación L79D	
36	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPT
37	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPT
38	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc con un conector GGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPTGGGTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
39	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPTGGGTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
	fusionado a un dominio Fc	ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
40	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc y con secuencia líder de TPA	MDAMKGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTVYEPPPTAPTGGGTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*

41	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc y con secuencia líder de TPA	MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWANS SG IELVKKGWCDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
42	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado que tiene una variante de la secuencia C-terminal (desvelado en el documento WO2007/053775)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSS GT IELVKKGWCDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSAGPEATAAGDQGSGALWLLEGPAHE
43	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado que tiene una variante de la secuencia C-terminal (desvelado en el documento WO2007/053775)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSS GT IELVKKGWCDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSAGPEATAAGDQGSGALWLLEGPAHE
	WO2007/053775) que tiene una mutación L79D	
44	Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado que tiene una variante de la secuencia C-terminal (desvelado en el documento WO2007/053775) que tiene una mutación L79D fusionado a un dominio Fc con un conector TGGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSS GT IELVKKGWCDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSAGPEATAAGDQGSGALWLLEGPAHE TGGGTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*

45	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 24	ATGGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGAAC AGGATAAAAG CCTCCATTGC TATGCCTCGT GGAGGAAC CTCCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGAC GACGATTICA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT GTTGCAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCGGTG GTGGAACCTCA CACATGCCA CCGTGCCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGGCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT
		GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA
46	Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64; SEQ ID NO: 29) fusionado a un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPPEVTYEPPPTAPTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64) con delección de los 15 aminoácidos C-terminales (SEQ ID NO: 30) fusionado a un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH EDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDI AVEWESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	Proteína precursora GDF11 sin procesar en su longitud total, es decir, preproteína GDF11	MVLAAPLLILGFLLLALEI LPRGEAAEGPAAAAAAAAAGVGGERSSRPAP SVAPEPDGCPVCVWRQHSRELRLIESIKSQILSKRLKEAPNISREVVKQLLPK APPLQQILDLHDFOQDALQPEDFLFEEDEYHATTEVTISMAQETDPAVQTDGSP LCCHFHFSPKVMFTKVKAQLWVYL RPVPATPVYLOILRLKPLTIGETAGGG GGGRRHIRIRSLKIELHSRGHWSQSIDFKQVLHSWFRQPQSNNWGLIEINAFDPS GTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKRSRRNLGLDCDEHSSESRCRCRYPL TVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFMQKYPHTHLVQQANPRGSAGPC CTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYKGKIPGMVVDRCGCS
49	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 48	ATGGTGCTCGCGGCCCCGCTGCTGCTGGCTTCCTGCTCCTCGCCCTG GAGCTGCAGGCCCCGGGGGAGGCAGGCGAGGGCCCCGCGGGCGGGCG GCGCGGGCGGGCGGGCGGGAGCGGGACGGCTGCCCGTG AGCCGGCCAGCCCCGTCCGTGGCGCCGAGCCGGACGGCTGCCCGTG TGC GTTGGCGGCAGCACAGCCGAGCTGCGCTAGAGAGCATCAAG

		TCGCAGATCTTGAGCAAAC TGCGGCTCAAGGAGGC GCCC AACATCAGC CGCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTGCCAAGGCGCCGCTGCAGCAG ATCCCTGGACCTACACGACTTCAGGGCAGCGCTGCAGCCGAGGAC TTCCCTGGAGGAGGACGAGTACCAAGGCCACCAGCAGACAGCTATTAGC ATGGCCCAGGAGACGGACCCAGCAGTACAGACAGATGGCAGCCCTCTC TGCTGCCATTTCACTTCACTCAGCCCCAAGGTGATGTTCACAAAGGTACTG AAGGCCAGCTGTGGGTGTACCTACGGCCTGTACCCCGCCCAGCCACA GTCTACCTGCAGATCTTGCAGTAAAACCCCTAACCTGGGAAGGGACC GCAGGGGGAGGGGGCGGAGGCCGGCGTCACATCCGTATCCGCTCACTG AAGATTGAGCTGCACTCACGCTCAGGCCATTGGCAGAGCATGACTTC AAGCAAGTGCTACACAGCTGGTCCGCCAGCCACAGAGCAACTGGGGC ATCGAGATCAACGCCATTGATCCCAGTGGCACAGACCTGGCTGTCA C TCCCTGGGGCGGGAGGCCGGAGGGCTGCATCCATTATGGAGCTTCGA GTCCTAGAGAACACAAAAGCTTCCCGGCGAACCTGGGTCTGGACTGC GACGAGCACTCAACCGAGTCCCCTGCTGCCATATCCCTCACAGTG GACTTGAGGCTTCCGGCTGGACTGGATCATCGCACCTAACGCGCTAC AAGGCCAACTACTGCTCCGGCAGTGCAGTACATGTTCATGCAAAAA TATCCGCATACCCATTGGTGAGCAGGCCAATCCAAGAGGGCTCTGCT GGGCCCTGTTGTACCCCCACCAAGATGTCCCCAATCAACATGCTCTAC TTCAATGACAAGCAGCAGATTATCTACGGCAAGATCCCTGGCATGGTG GTGGATCGCTGTGGCTGCTCT
50	Propéptido GDF11 de proteína GDF11 humana	AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGERSSRPAPSVAPEPDGCPVCWRQHSR ELRLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQQIQLDLHDFQ GDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPAVQTDGSPLCCHFHSP KVMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGR RHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFQPQSNWGLIEINA FDP SGTDLAVTSLGPAGEGLHPFMELRVLENTKRSRR
51	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 50	GCCGAGGGCCCCCGCGCGGCCGGCGGGCGGGCGGGCGAGCG CGGGGGGTCTGGGGGGAGCGCTCCAGCCGCCAGCCCCGTCCGTGGCG CCCGAGCCGGACGGCTGCCCGTGTGCCTTGGCGGAGCACAGCCGC GAGCTGCGCCTAGAGAGCATCAAGTCGAGATCTTGAGCAAAC TGC GG CTCAAGGAGGCGCCAACATCAGCCCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTG CCCAAGGCCGCCGCTGCAGCAGATCTGGACCTACAGACTTCCAG GGCAGCGCTGCAGCCCGAGGACTTCCCTGGAGGAGGACGAGTACAC
		GCCACCACCGAGACCGTCATTAGCATGGCCAGGAGACGGACCCAGCA GTACAGACAGATGGCAGCCCTCTGCTGCCATTTCACTTCA GCCCCC AAGGTGATGTTCACAAAGGTACTGAAGGCCAGCTGTGGGTGTACCTA CGGCCTGTACCCCGCCAGCACAGTCTACCTGCAGATCTTGCAGACTA AAACCCCTAACTGGGGAGGGACCGCAGGGGGAGGGGGCGGAGGCCGG CGTCACATCCGTATCCGCTACTGAAGATTGAGCTGCAC TCA GCGCTCA GGCCATTGGCAGAGCATCGACTTCAAGCAAGTGCTACACAGCTGGTT C CGCCAGCCACAGAGCAACTGGGCATCGAGATCAACGCCCTTGATCCC AGTGGCACAGACCTGGCTGTCA CCTCCCTGGGGCGGGAGCCGAGGGG CTGCATCCATTATGGAGCTCGAGTCTAGAGAACACAAAAGTTCC CGGCCG
52	Proteína GDF11 humana madura	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEA FGWDWIIAPKRYKANYCSGQCE YMFMQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYG KIPGMVVDRCGCS
53	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 52	AACCTGGGTCTGGACTGCAGAGCACTCAAGCGAGTCCCCTGCTGC CGATATCCCTCACAGTGGACTTGGAGGCTTCCGGACTGGATC ATCGCACCTAACGCTACAAGGCCAACTACTGCTCCGGCCAGTGCAG TACATGTTCATGCAAAATATCCGCATACCCATTGGTGCAGCAGGCC AATCCAAGAGGCTCTGCTGGGGCTGTGACCCCAACCAAGATGTCC CCAATCAACATGCTCTACTTCAATGACAAGCAGCAGATTATCTACGGC AAGATCCCTGGCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGCTCT
54	Dominio extracelular de ActRIIA murino fusionado a un dominio Fc murino («mActRIIA-Fc»)	Equivalente murino de la SEQ ID NO: 7. Comprende IgG2a murina fusionada al dominio extracelular de ActRIIA.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Celgene Corporation, Washington University

5 <120> ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRII Y USOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS ÓSEOS Y
OTROS TRASTORNOS

<130> 103811PCEPT1

10 <140> 17190589.6
<141> 2013-11-01

<150> 61/721,898
<151> 2012-11-02

15 <150> 61/740,665
<151> 2012-12-21

<160> 53

20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
<211> 513

25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Polipéptido precursor de ActRIIA humano

30 <400> 1

Met	Gly	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Phe	Ala	Val	Phe	Leu	Ile	Ser	Cys
1					5				10					15	
Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Leu	Gly	Arg	Ser	Glu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Phe
					20			25					30		
Phe	Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Lys	Asp	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Val	Glu
					35			40					45		
Pro	Cys	Tyr	Gly	Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	His	Cys	Phe	Ala	Thr	Trp
	50				55				60						
Lys	Asn	Ile	Ser	Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Leu
	65					70				75				80	
Asp	Asp	Ile	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Val	Glu	Lys	Asp	
					85			90					95		
Ser	Pro	Glu	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Met	Cys	Asn	Glu	
					100			105					110		
Lys	Phe	Ser	Tyr	Phe	Pro	Glu	Met	Glu	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Asn
	115					120				125					
Pro	Val	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Ile	Leu	Leu	Tyr	Ser	Leu
	130					135				140					
Val	Pro	Leu	Met	Leu	Ile	Ala	Gly	Ile	Val	Ile	Cys	Ala	Phe	Trp	Val
	145					150				155				160	
Tyr	Arg	His	His	Lys	Met	Ala	Tyr	Pro	Pro	Val	Leu	Val	Pro	Thr	Gln
					165			170					175		
Asp	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu
						180			185				190		
Gln	Leu	Leu	Glu	Val	Lys	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Gly	Cys	Val	Trp	Lys
	195					200						205			
Ala	Gln	Leu	Leu	Asn	Glu	Tyr	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Ile	Gln
	210					215					220				
Asp	Lys	Gln	Ser	Trp	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Val	Tyr	Ser	Leu	Pro	Gly
	225					230				235				240	

ES 2 884 095 T3

Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly
 245 250 255
 Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys
 260 265 270
 Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
 275 280 285
 Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
 290 295 300
 Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
 305 310 315 320
 Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
 325 330 335
 Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
 340 345 350
 Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro
 355 360 365
 Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg
 370 375 380
 Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg
 385 390 395 400
 Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu
 405 410 415
 Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val
 420 425 430
 Val His Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
 435 440 445
 Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
 450 455 460
 Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr
 465 470 475 480
 Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
 485 490 495
 Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
 500 505 510
 Leu

<210> 2

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular) procesado

10

<400> 2

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

15 <210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos

C-terminales

<400> 3

5 100

<210> 4

<211> 1542

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de ActRIIA humano

15 <400> 4

<210> 5

20 <211> 345

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

25 <223> Polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular)

<400> 5

atacttggta gatcagaaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
 agaaccatac aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
 tttgctacctt ggaagaatat ttctggttcc attgaaatacg taaaacaagg ttgttgctg 180
 gatgatatac actgctatga caggactgat tgttagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
 tattttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccc 345

5 <210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Constructo sintético - un dominio Fc

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Asp o Ala

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (100)..(100)
 <223> Lys o Ala

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (212)..(212)
 <223> Asn o Ala

30 <400> 6

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
1	5	10	15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
20	25	30	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp			
35	40	45	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
50	55	60	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
65	70	75	80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
85	90	95	
Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys			
100	105	110	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
115	120	125	
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
145	150	155	160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
165	170	175	
Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
180	185	190	
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
195	200	205	
Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
210	215	220	
Lys			
225			

35 <210> 7
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 884 095 T3

<220>

<223> Constructo sintético: domino extracelular de ActRIIA humano fusionado a un dominio Fc humano

<400> 7

5

```

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

```

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

10 <210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

15 <220>

<223> Secuencia líder de melitina de abeja melífera

<400> 8

20

```

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1      5          10          15
Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

```

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

25 <213> Desconocida

<220>

<223> Secuencia líder de activador del plasminógeno tisular (TPA)

5 <400> 9

```
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly
   1           5          10          15
Ala Val Phe Val Ser Pro
   20
```

10 <210> 10

10 <211> 20

10 <212> PRT

10 <213> Desconocida

15 <220>

15 <223> Líder de ActRIIA nativo

15 <400> 10

```
Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
   1           5          10          15
Ser Ser Gly Ala
   20
```

20 <210> 11

20 <211> 9

20 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

25 <220>

25 <223> Constructo sintético: secuencia N-terminal de ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc

25 <400> 11

30 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu
 1 5

35 <210> 12

35 <211> 329

35 <212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

35 <220>

40 <223> Constructo sintético: proteína ActRIIA-Fc con delección de los 15 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular de ActRIIA

40 <400> 12

ES 2 884 095 T3

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

<210> 13

<211> 369

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético: ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia líder de TPA

10 <400> 13

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr
 20 25 30
 Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn
 35 40 45
 Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His
 50 55 60
 Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys
 65 70 75 80
 Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys
 85 90 95
 Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly
 100 105 110
 Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr
 115 120 125
 Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly
 130 135 140
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 165 170 175
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 180 185 190
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 195 200 205
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 210 215 220
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 225 230 235 240
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 245 250 255
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 260 265 270
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 275 280 285
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 290 295 300
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 305 310 315 320
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 325 330 335
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 340 345 350
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365
 Lys

<210> 14

<211> 1114

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético: ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia líder de TPA

10 <400> 14

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgggtggagc agtcttcgtt 60
tcgccccggcg cccgtataact tggtagatca gaaactcagg agtgttttt tttaatgcta 120
attggaaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgacc gtgttatggt gacaaagata 180

```

aacggccgca ttgtttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
 agtgtttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgttag aaaaaaaaaaaga 300
 cagccctgaa gtatatttct gttgtgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agtttctta 360
 ttttcggag atggaagtca cacagccac ttcaaattcca gttacaccta agccaccac 420
 cggtgtgga actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
 agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt 540
 cacatgcgtg gtggtgacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtagt 600
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac 660
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
 caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaaacca tctccaaagc 780
 caaaggccag ccccgagaac cacaggtgtc caccctgccc ccattccggg aggagatgac 840
 caagaaccag gtcagcgtc cctgccttgtt cccaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
 ggagtggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
 ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
 gggaaacgtc ttctcatgtc ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
 gacccctccctc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

<210> 15

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético: secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 4 aminoácidos C-terminales del dominio EC

<400> 15

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

15

<210> 16

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> Polipéptido precursor de ActRIIB humano

<400> 16

25

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

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160
 Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175
 Gly Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190
 Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205
 Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220
 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240
 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255
 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 17

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado

10 <400> 17

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

<210> 18

<211> 101

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales

<400> 18

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

15

<210> 19

<211> 1539

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> Precursor de ActRIIB (A64) humano

<400> 19

25

```

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcatt tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
accaaccaga gcccccttgg a ggcgtcgaa ggcgagcagg acaaggcgct gcactgctac 180
gcctccttggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggcttagat 240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac 300
ttctgctgtct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatttgcc agaggctggg 360
ggcccgaaag tcacgtacga gccacccccc acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420
tactcactgc tgcccatcggttcc ctcatcggtcc tgctggccctt ttggatgtac 480

```

ES 2 884 095 T3

```

cggcatcgca agccccctca cggtcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
ccatcccctc tggtgtggct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc 600
tttggctgtg tctggaaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttcca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtgaa cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
caccgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcggag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caagggaaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgtg gcagagacga tgtcacaggc cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtccctg gtgcgtggc gagggccaca agccgttat tgcccacagg 960
gactttaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacactca cagccgtgt ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttgcattga gccaggaaa cttccagggg acacccacgg acaggttaggc 1080
acagagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgtg tgccatgggg ttgggtctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagttac atgctccctt ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggagggtg gtggtgccaca agaagatgag gcccaccatt 1320
aaagatcaact ggttgaaca cccggcctg gcccagctt gtgtgaccat cgaggagtgc 1380
tggaccatg atgcagagggc tcgcttgcgc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggt cggtaaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gaccctctgtc 1500
accatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

<210> 20

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético: proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB fusionado a un dominio Fc

<400> 20

```

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

```

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 21

<211> 329

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético: proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64) con delección de los 15 aminoácidos C-terminales fusionado a un dominio Fc

<400> 21

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

15

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 22

<211> 105

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 884 095 T3

<220>

<223> secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 5 aminoácidos C-terminales del dominio EC y con una mutación L79D

5 <400> 22

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

10 <210> 23

10 <211> 107

10 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

15 <220>

15 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC y con una mutación L79D

<400> 23

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

20 <210> 24

20 <211> 360

20 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC, con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA

30 <400> 24

ES 2 884 095 T3

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 35 40 45
 Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60
 Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu
 85 90 95
 Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu
 100 105 110
 Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu
 115 120 125
 Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 165 170 175
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 260 265 270
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 25

<211> 335

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y
 10 delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC y con una mutación L79D

<400> 25

ES 2 884 095 T3

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

<210> 26

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado

10 <400> 26

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

15

ES 2 884 095 T3

<210> 27
<211> 100
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales
10 <400> 27

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

15 <210> 28
<211> 512
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
20 <223> Polipéptido precursor de ActRIIB humano

<400> 28

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

ES 2 884 095 T3

115	120	125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu	Leu Thr Val	Leu Ala Tyr Ser
130	135	140
Gly Leu Ser Leu Ile Val	Leu Ala Phe Trp	Met Tyr
145	150	155
Arg His Arg Lys Pro Pro	Tyr Gly His Val Asp	Ile His Glu Asp
165	170	175
Gly Pro Pro Pro Ser Pro	Leu Val Gly	Leu Lys Pro
180	185	190
Leu Glu Ile Lys Ala Arg	Gly Arg Phe Gly Cys	Val Trp Lys Ala Gln
195	200	205
Leu Met Asn Asp Phe Val	Ala Val Lys Ile Phe	Pro Leu Gln Asp
210	215	220
Gln Ser Trp Gln Ser	Glu Arg Glu Ile Phe	Ser Thr Pro Gly Met
225	230	235
His Glu Asn Leu	Gln Phe Ile Ala Ala	Glu Lys Arg Gly Ser
245	250	255
Leu Glu Val Glu Leu Trp	Leu Ile Thr Ala Phe	His Asp Lys Gly Ser
260	265	270
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys	Gly Asn Ile Ile Thr	Trp Asn Glu Leu Cys
275	280	285
His Val Ala Glu Thr Met	Ser Arg Gly	Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
290	295	300
Val Pro Trp Cys Arg	Gly Glu Gly His Lys	Pro Ser Ile Ala His Arg
305	310	315
Asp Phe Lys Ser Lys Asn	Val Leu Leu Lys	Ser Asp Leu Thr Ala Val
325	330	335
Leu Ala Asp Phe Gly	Leu Ala Val Arg Phe	Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340	345	350
Gly Asp Thr His Gly	Gln Val Gly Thr Arg	Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355	360	365
Val Leu Glu Gly Ala Ile	Asn Phe Gln Arg	Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370	375	380
Asp Met Tyr Ala Met	Gly Leu Val Leu Trp	Glu Leu Val Ser Arg Cys
385	390	395
Lys Ala Ala Asp Gly	Pro Val Asp Glu	Tyr Met Leu Pro Phe Glu
405	410	415
Glu Ile Gly Gln His	Pro Ser Leu Glu	Leu Gln Glu Val Val Val
420	425	430
His Lys Lys Met Arg	Pro Thr Ile Lys Asp	His Trp Leu Lys His Pro
435	440	445
Gly Leu Ala Gln	Leu Cys Val Thr Ile	Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450	455	460
Ala Glu Ala Arg	Leu Ser Ala Gly	Cys Val Glu Glu Arg Val Ser
465	470	475
Ile Arg Arg Ser Val	Asn Gly Thr Thr	Ser Asp Cys Leu Val Ser
485	490	495
Val Thr Ser Val Thr	Asn Val Asp	Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser
500	505	510

<210> 29

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado

10

<400> 29

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

ES 2 884 095 T3

20 25 30

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

<210> 30
<211> 101
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales
10 <400> 30

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

15 <210> 31
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado
<400> 31

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

<210> 32
30 <211> 100

ES 2 884 095 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 15 aminoácidos C-terminales
<400> 32

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

10 <210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC y con una mutación L79D
<400> 33

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

20 <210> 34
<211> 360
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC, con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA
<400> 34

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 35 40 45
 Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60
 Ala Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu
 85 90 95
 Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu
 100 105 110
 Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu
 115 120 125
 Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 165 170 175
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 260 265 270
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 35

<211> 335

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y
delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC y con una mutación L79D

<400> 35

ES 2 884 095 T3

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

<210> 36

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) con mutación L79D

10

<400> 36

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

15

ES 2 884 095 T3

5 <210> 37
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) con mutación L79D

15 <400> 37
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110
 Ala Pro Thr
 115

15 <210> 38
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con mutación L79D fusionado a un
dominio Fc con un conector GGG

25 <400> 38
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His

ES 2 884 095 T3

	85	90	95
Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr			
100	105	110	
Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
115	120	125	
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
130	135	140	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
145	150	155	160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
165	170	175	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
180	185	190	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
195	200	205	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
210	215	220	
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
225	230	235	240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys			
245	250	255	
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
260	265	270	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
275	280	285	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
290	295	300	
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
305	310	315	320
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
325	330	335	
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
340			

<210> 39

<211> 343

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con mutación L79D fusionado a un dominio Fc

<400> 39

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

ES 2 884 095 T3

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

<210> 40

<211> 368

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con mutación L79D fusionado a un dominio Fc y con secuencia líder de TPA

<400> 40

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

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 195 200 205
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 210 215 220
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 225 230 235 240
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 245 250 255
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 275 280 285
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 290 295 300
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 305 310 315 320
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 340 345 350
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 41

<211> 368

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado con mutación L79D fusionado a un dominio Fc y con secuencia líder de TPA

<400> 41

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

ES 2 884 095 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 225 230 235 240
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 245 250 255
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 275 280 285
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 290 295 300
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 305 310 315 320
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 340 345 350
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 42

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido ActRIIA humano soluble (extracelular) procesado que tiene una variante de la secuencia C-terminal

10

<400> 42

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

15

<210> 43

<211> 141

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado que tiene una variante de la secuencia C-terminal que tiene una mutación L79D

<400> 43

25

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

ES 2 884 095 T3

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

<210> 44

<211> 370

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de polipéptido ActRIIB humano soluble (extracelular) procesado que tiene una variante de la secuencia C-terminal que tiene una mutación L79D fusionado a un dominio Fc con un conector TGGG

<400> 44

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

ES 2 884 095 T3

275	280	285
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
290	295	300
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
305	310	315
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
325	330	335
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
340	345	350
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
355	360	365
Gly Lys		
370		

<210> 45

<211> 1083

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con delección de los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC y
delección de los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC, con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA

<400> 45

```

atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tcgccccggcg ccggccaaac ccgcgaatgt atttattaca atgctaattt ggaactcgaa 120
ccgacgaaacc aatccgggtt cgaacgggtt gaggggggaaac aggataaacg cctccattgc 180
tatgcgttgtt ggaggaactc ctccgggacg attgaactgtt tcaagaaaagg gtgtgggac 240
gacgatttca atttttatga ccgcaggaa tgtgtcgca ccgaagagaa tccgcaggtc 300
tattttctgtt gttcgaggg gaatttctgtt aatgaacggt ttacccacct cccccaagcc 360
ggcggggcccg aggtgaccta tgaacccccc cccaccgggtt gtggaactca cacatgccca 420
ccgtgcccacg caccgtqaact cctggggggc ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaaccc 480
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccctt gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc 540
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaacttg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600
aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 660
gtcctgcacc aggactgtt gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc 720
ctcccaagcccccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagcccc agaaccacac 780
gtgtacacccc tgccccccatc ccggggaggatg accaccaaga accaggttcag cctgacccgtc 840
ctggtaaaag gcttctatcc cagcgcacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg 900
gagaacaact acaagaccac gcctccctgtt ctggactccg acggctctt cttctctat 960
agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtt cagcagggggaa acgtcttctc atgtccgtt 1020
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc cccggtaaaa 1080
tga
1083

```

15

<210> 46

<211> 344

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB fusionado a un dominio Fc

<400> 46

25

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala	1	5
		10
		15
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu		
20	25	30
Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser		
35	40	45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
 50 55 60
 Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95
 His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
 100 105 110
 Thr Ala Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 47

<211> 329

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64) con delección de los 15 aminoácidos C-terminales fusionado a un dominio Fc

<400> 47

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

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 48

<211> 407

5 <212> PRT

<213> Desconocida

<220>

<223> Proteína precursora GDF11 sin procesar en su longitud total (preproteína GDF11)

10

<400> 48

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

ES 2 884 095 T3

165	170	175
Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr		
180	185	190
Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr		
195	200	205
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu		
210	215	220
Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe		
225	230	235
Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly		
245	250	255
Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr		
260	265	270
Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg		
275	280	285
Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys		
290	295	300
Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val		
305	310	315
Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr		
325	330	335
Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys		
340	345	350
Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala		
355	360	365
Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr		
370	375	380
Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val		
385	390	395
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser		
405		

<210> 49

<211> 1221

5 <212> ADN

<213> Desconocida

<220>

<223> Proteína precursora GDF11 sin procesar en su longitud total (preproteína GDF11)

10 <400> 49

```

atgggtgctcg cggccccgt gctgctggc ttccctgctcc tcgccttga gctgcggccc 60
cggggggaggc cggccgaggg ccccgccgca gccggccggcg cggccggccg gcggcagcg 120
gcgggggtcg ggggggagcg ctccagccgg ccagccccgt ccgtggccgc cgagccggac 180
ggctgccccg tggcggtttg gccggcagcac agccgcgagc tgccctaga gagcatcaag 240
tcgcagatct tgagcaaactg gccggctcaag gaggcgccca acatcagccg cgagggtgg 300
aagcagctgc tgcccaagggc gcccggctg cagcagatcc tggacctaca cgacttccag 360
ggcgacgcgc tgcaagccca ggacttcctg gaggaggacg agtaccacgc caccaccgag 420
accgtcatta gcatggccca ggagacggac ccagcagttac agacagatgg cagccctctc 480
tgctgccatt ttcaacttcag ccccaaggtg atgttcacaa agtgtactgaa ggcccagctg 540
tgggtgtacc tacggccctgt accccgccccca gccacagtct acctgcagat cttgcgacta 600
aaacccctaa ctggggaaagg gaccgcaggg ggagggggcg gaggccggcg tcacatccgt 660
atccgctcac tgaagatgta gctgcactca cgctcaggcc attggcagag catcgacttc 720
aagcaagtgc tacacagctg gttccggccag ccacagagca actggggcat cgagatcaac 780
gcctttgatc ccagtggcac agacccggct gtcacccccc tggggccggg agccgagggg 840
ctgcacatccat tcatggact tcgacttccta gagaacacaa aacgtttcccg gcgaaacctg 900
ggctggact gcgacgcgca ctcaagcgcg tcccgctgt gccgatatacc cctcacagtg 960
gactttgagg ctttcggctg ggactggatc atcgcaccta agcgttacaa ggccaactac 1020
tgctccggcc agtgcgagta catgttcatg caaaaatatac cgcataccca ttttgtgcag 1080
caggccaatc caagaggctc tgctggccccc tggatccccc ccaccaagat gtcccaatc 1140
aacatgtct acttcaatga caagcagcag attatctacg gcaagatccc tggcatggtg 1200

```

15 gtggatcgct gtggctgctc t 1221

<210> 50

<211> 274

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

ES 2 884 095 T3

<220>

<223> Propéptido GDF11 de proteína humana GDF11

<400> 50

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

<210> 51

<211> 822

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Propéptido GDF11 de proteína humana GDF11

15 <400> 51

gcccaggggcc cccggggcgc ggcggcgccg gcggcgcccg cgccagccgc ggggtcgccg 60
 ggggagcgct ccagccggcc agccccgtcc gtggcgcccg agccggacgg ctgccccgtg 120
 tgcgtttggc ggcagcacag cccgagctg ccccttagaga gcatcaagtc gcagatctt 180
 agcaaaactgc ggctcaagga ggcggccaaac atcagccgcg aggtgtgaa gcagctgctg 240
 cccaaggcgc cggcgctgca gcagatcctg gacctacacg acttccaggg cgacgcgtg 300

cagccccgagg acttccctgga ggaggacgag taccacgcca ccaccgagac cgtcatttgc 360
 atggccccagg agacggaccc agcaagtacag acagatggca gcccctctg ctgccatccc 420
 cacttcagcc ccaagggtat gttcacaaaag gtactgaagg cccagctgtg ggtgtaccta 480
 cgccctgtac cccgcccagc cacagtctac ctgcagatct tgccactaaa acccctaact 540
 ggggaaaggga cccgaggggg agggggcgga ggcggcgcc acatccgtat ccgctactg 600
 aagattgagc tgcactcaacg ctcaggccat tggcagagca tcgactcaa gcaagtgtca 660
 cacagcttgttccgcccac acagagcaac tggggcatcg agatcaacgc ctttgatccc 720
 atggccacag acctggctgt cacccctg gggccgggag ccgaggggct gcatccattc 780
 atggagcttc gagtcctaga gaacacaaaaa cgttcccgcc gg 822

<210> 52

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Proteína GDF11 humana madura

<400> 52

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

10 <210> 53

<211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> Propéptido GDF11 de proteína humana GDF11

<400> 53

aacctgggtc	tggactgcga	cgagcaactca	agcgagtccc	gctgctgccg	atatccccctc	60
acagtggact	ttgaggcttt	cggctggac	tggatcatcg	cacctaagcg	ctacaaggcc	120
aactactgct	ccggcccaatcg	cgagtttacatg	ttcatgc当地	aatatccca	taccatgg	180
gtgcagcagg	ccaatccaag	aggctctgtct	gggcccgtt	gtaccccac	caagatgtcc	240
ccaatcaaca	tgctctactt	caatgacaag	cagcagat	tctacggcaa	gatccctggc	300
atgggtgg	atcgctgtgg	ctgctct				327

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de ActRII para su uso en un método para tratar el trastorno mineral y óseo asociado a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD) en un sujeto, donde dicho inhibidor de ActRII es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

- 5 a) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2;
 b) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2;
 c) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:2;
 d) SEQ ID NO:2;
 e) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:3;
10 f) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:3;
 g) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:3;
 h) SEQ ID NO:3;
 i) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:7;
 j) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:7;
15 k) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:7;
 l) SEQ ID NO:7;
 m) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:12;
 n) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:12;
 o) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:12;
20 p) SEQ ID NO:12;
 q) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:17;
 r) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:17;
 s) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:17;
 t) SEQ ID NO:17;
25 u) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:20;
 v) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:20;
 w) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:20;
 x) SEQ ID NO:20;
 y) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:21;
30 z) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:21;
 aa) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:21;
 bb) SEQ ID NO:21;
 cc) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:23;
 dd) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:23;
35 ee) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:23;
 ff) SEQ ID NO:23;
 gg) 90 % idéntica a la SEQ ID NO:25;

- hh) 95 % idéntica a la SEQ ID NO:25;
- ii) 98 % idéntica a la SEQ ID NO:25; y
- jj) SEQ ID NO:25.
- 5 2. El inhibidor de ActRII para su uso de la reivindicación 1, donde dicho inhibidor de ActRII es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.
3. El inhibidor de ActRII para su uso de la reivindicación 1, donde dicho inhibidor de ActRII es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25.
4. El inhibidor de ActRII para su uso de la reivindicación 1, donde dicho inhibidor de ActRII es un polipéptido que comprende: (i) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23; (ii) un conector; y (iii) una porción Fc de IgG1.
- 10 5. El inhibidor de ActRII para su uso de la reivindicación 1, donde dicho inhibidor de ActRII es un polipéptido que consiste en: (i) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23; (ii) un conector; y (iii) una porción Fc de IgG1.
6. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el CKD-MBD es una forma de trastorno óseo adinámico de CKD-MBD.
- 15 7. El inhibidor de ActRII para su uso de la reivindicación 6, donde el trastorno óseo adinámico está caracterizado por la ausencia de incorporación de tetraciclina en el hueso mineralizado.
8. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el CKD-MBD es una forma de bajo recambio óseo de CKD-MBD.
9. El inhibidor de ActRII para su uso de la reivindicación 8, donde la forma de bajo recambio óseo de CKD-MBD es osteomalacia.
- 20 10. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el inhibidor de ActRII se administra por vía parenteral.
11. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el sujeto tiene menos de 18 años.
- 25 12. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el sujeto tiene enfermedad renal en etapa terminal.
13. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el sujeto se está sometiendo a diálisis.
14. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el sujeto tiene una enfermedad renal crónica.
- 30 15. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la enfermedad renal crónica ha alcanzado la etapa 3, la etapa 4, la etapa 5 o la etapa 5D.
16. El inhibidor de ActRII para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la enfermedad renal crónica es una enfermedad renal en etapa terminal.

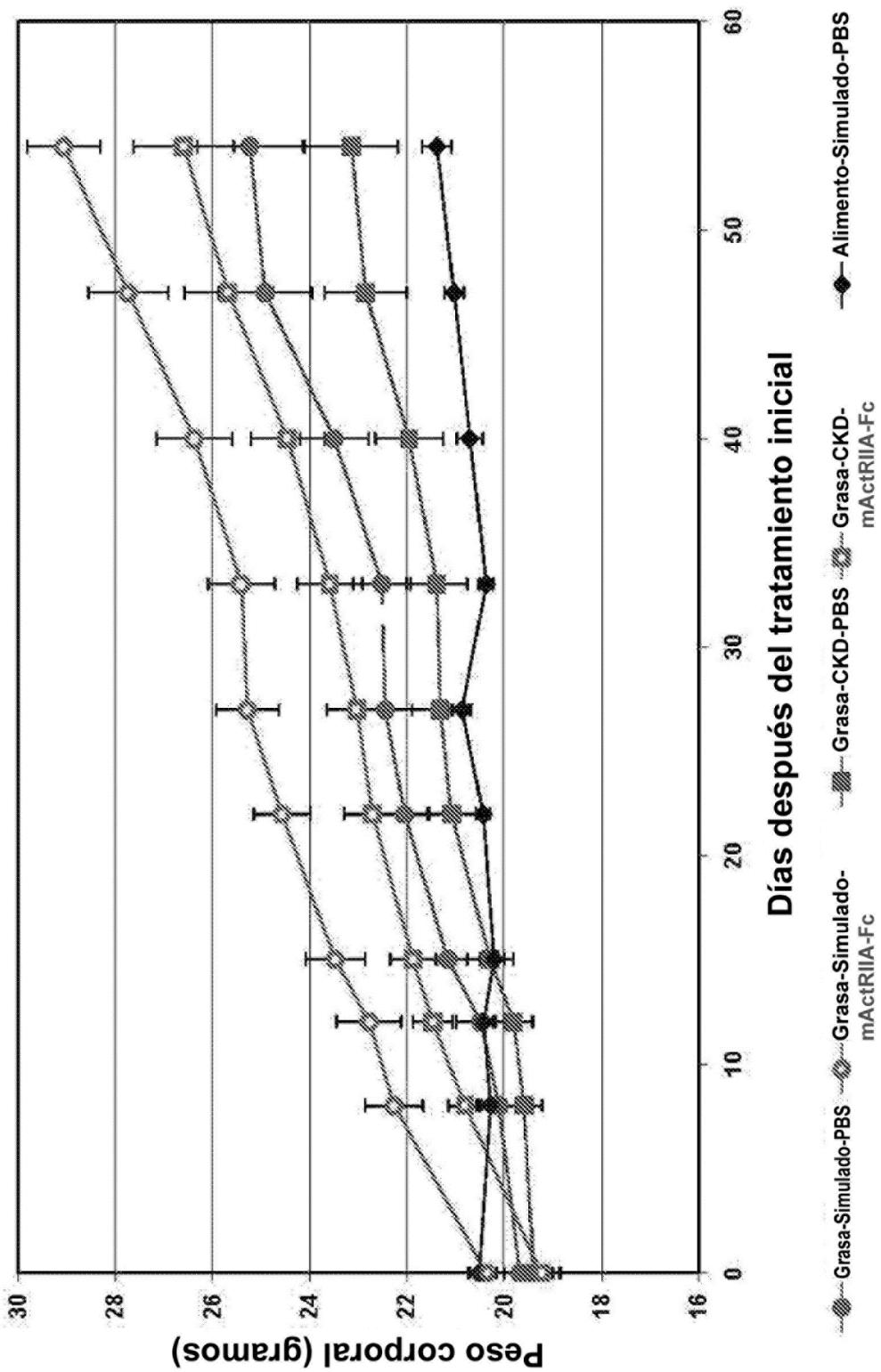


FIGURA 1

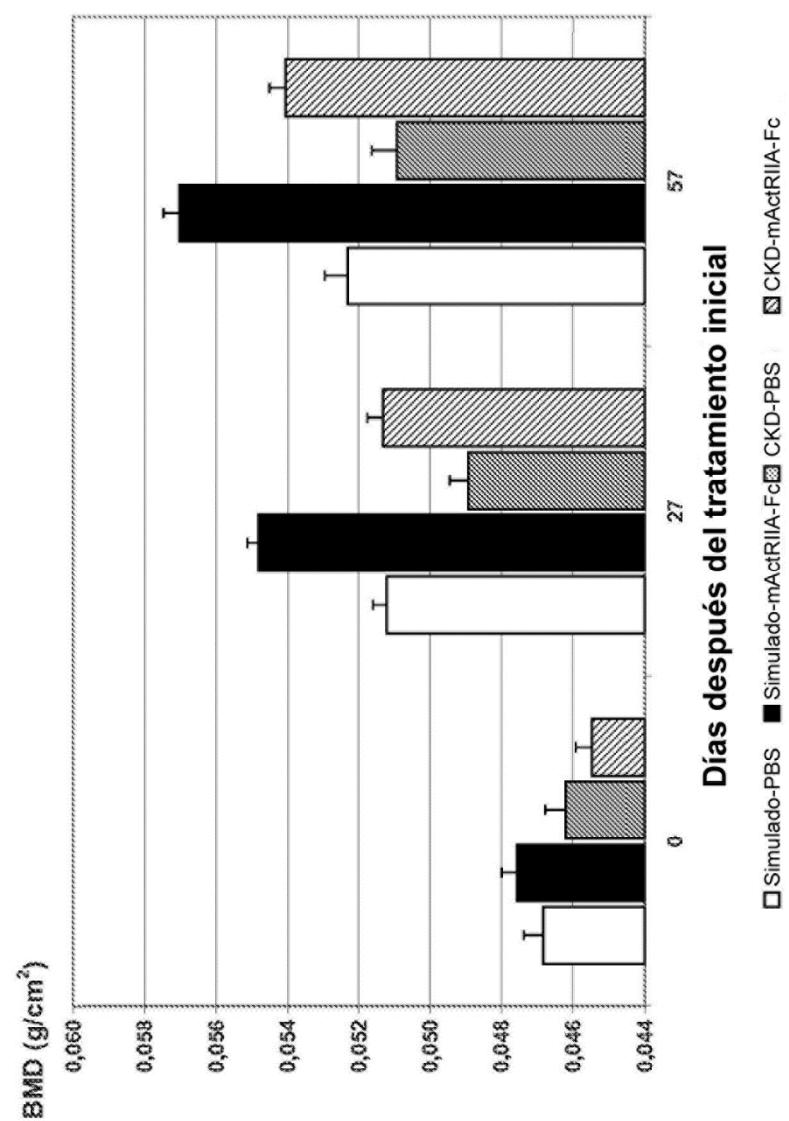


FIGURA 2

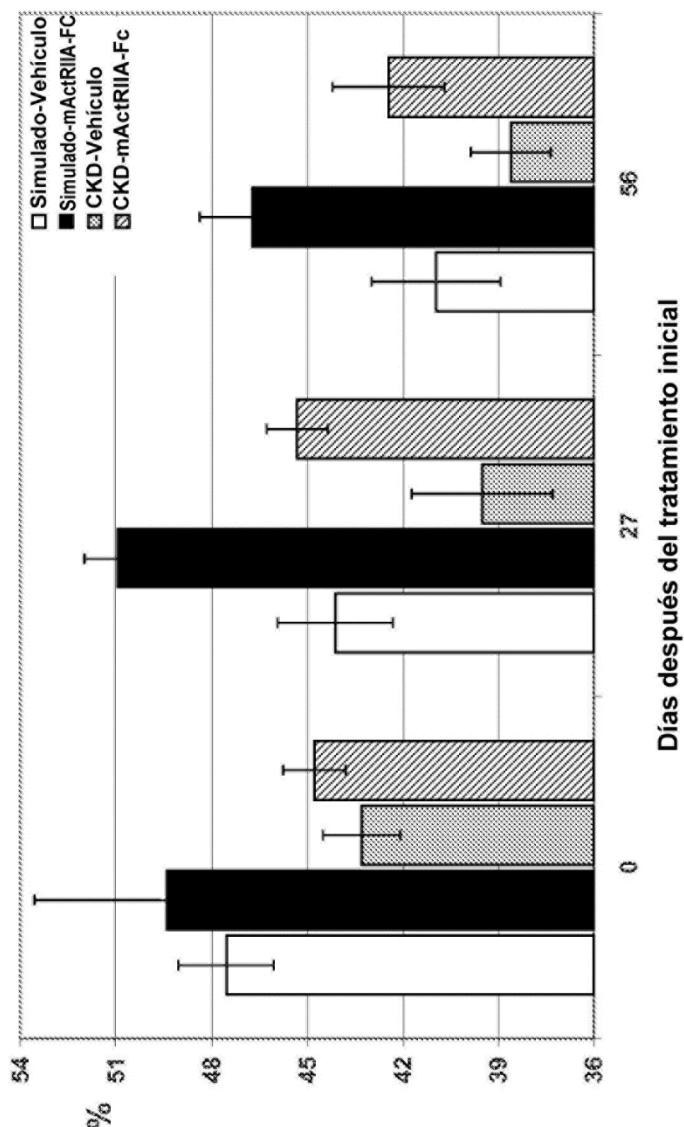
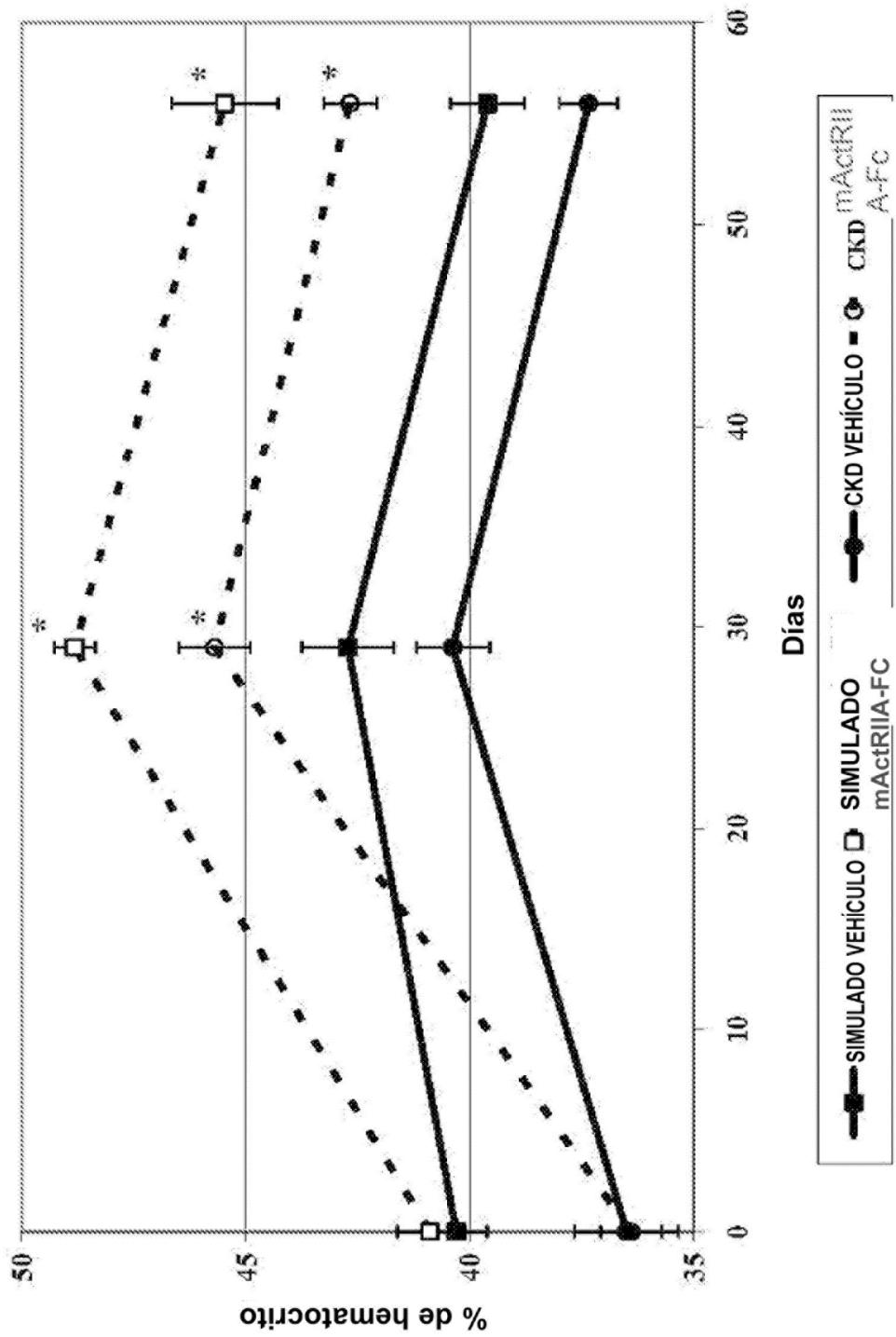


FIGURA 3



FIGURA 4



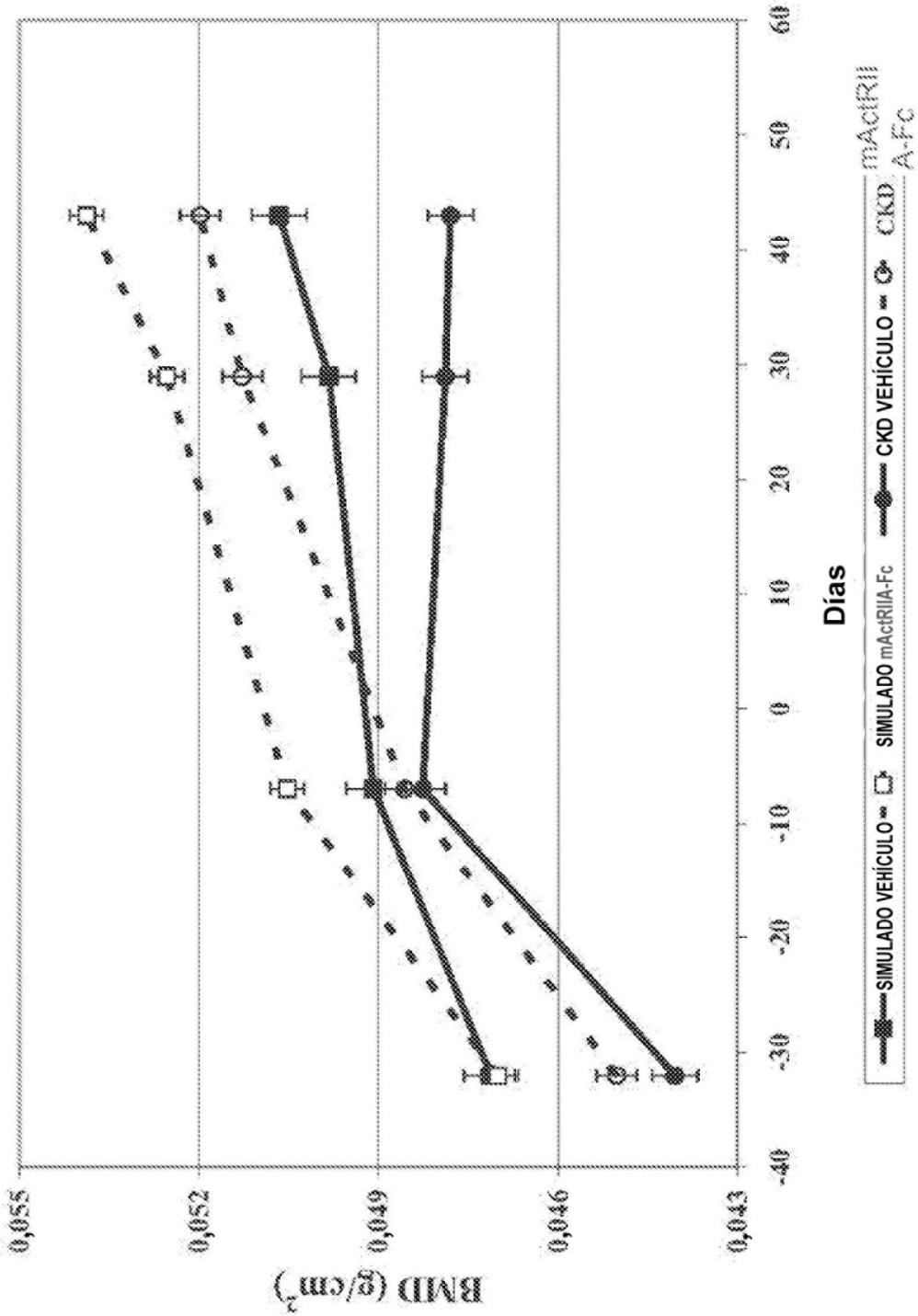


FIGURA 6

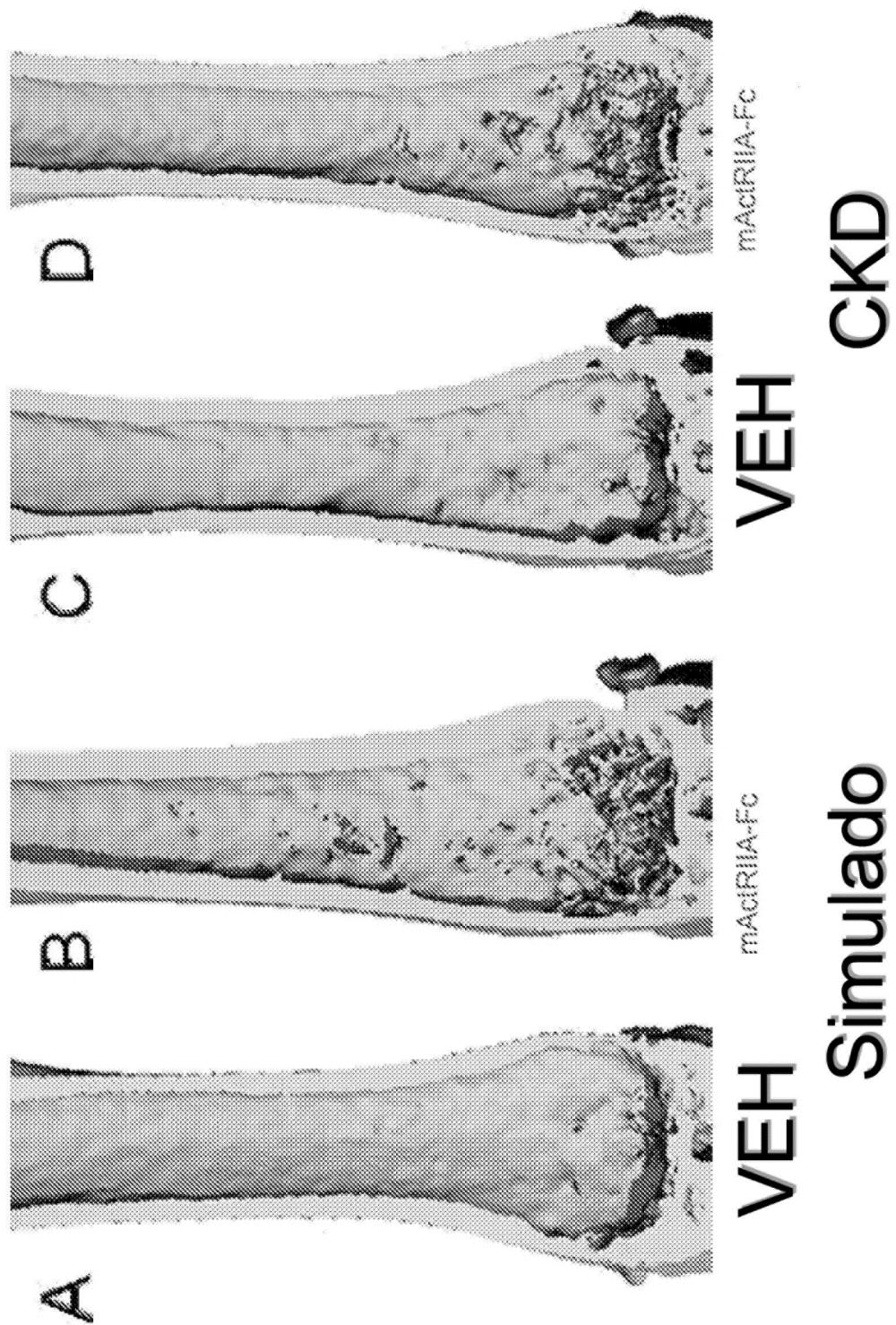


FIGURA 7

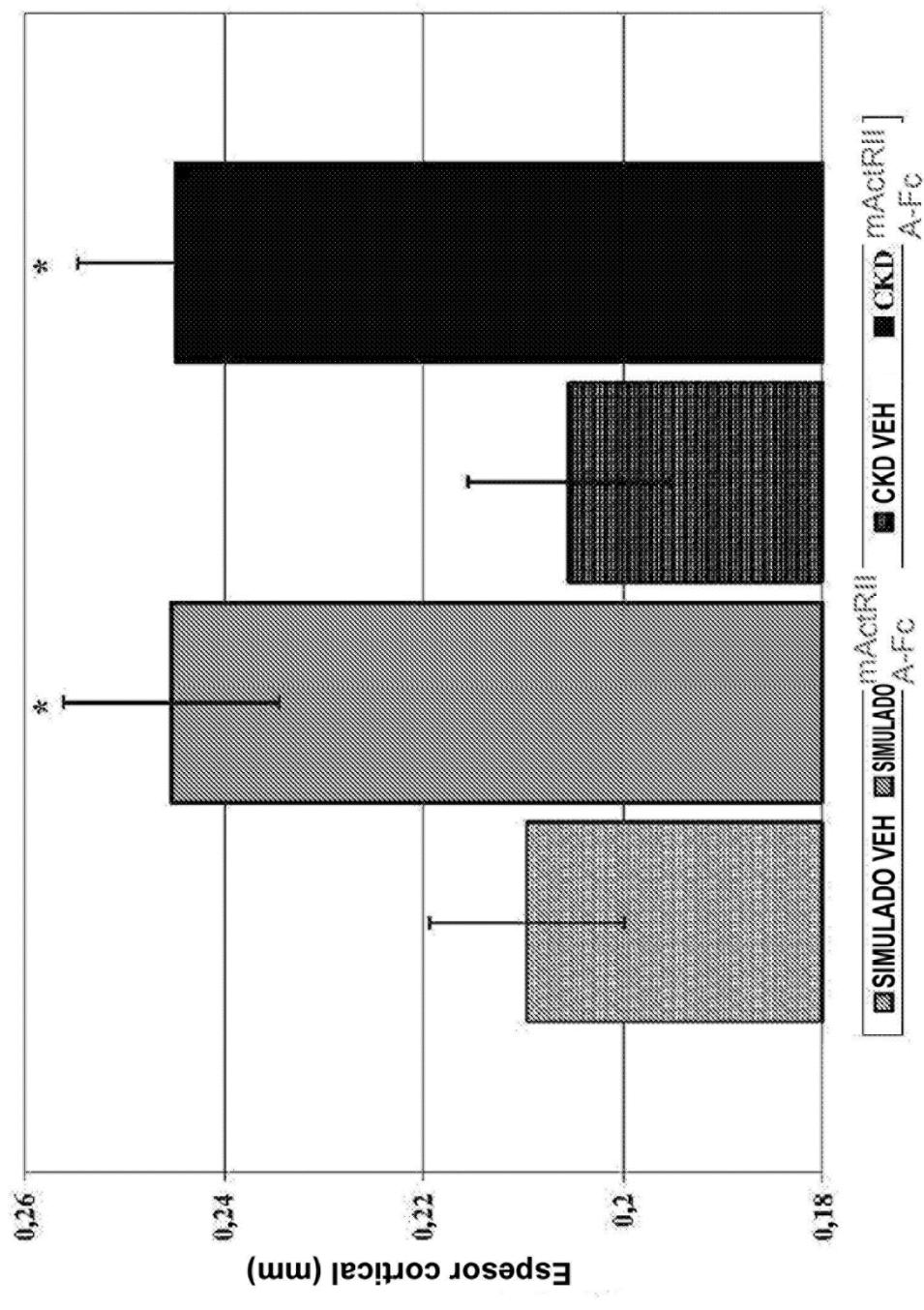


FIGURA 8

* = $p \leq 0,01$ contra VEH

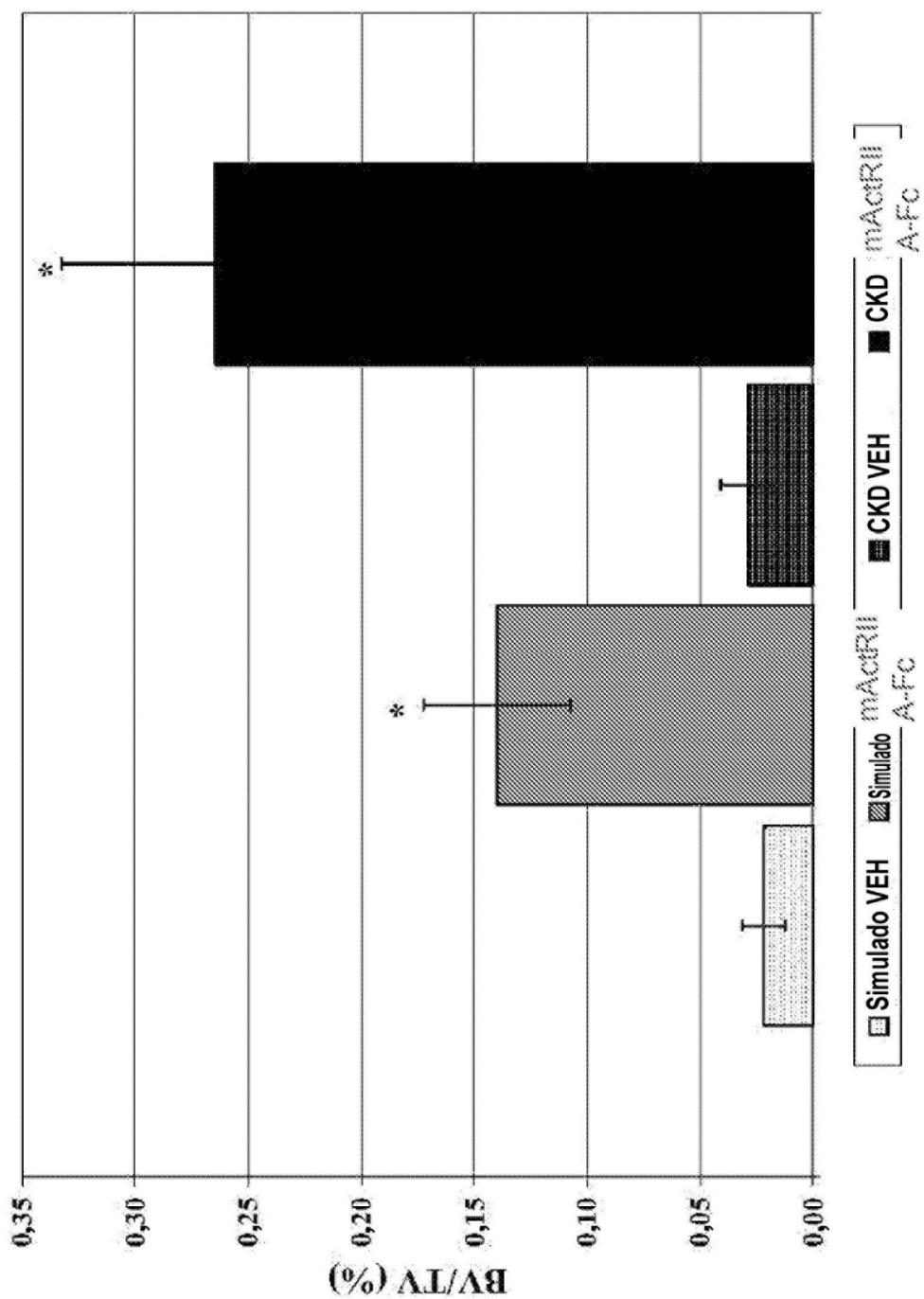


FIGURA 9

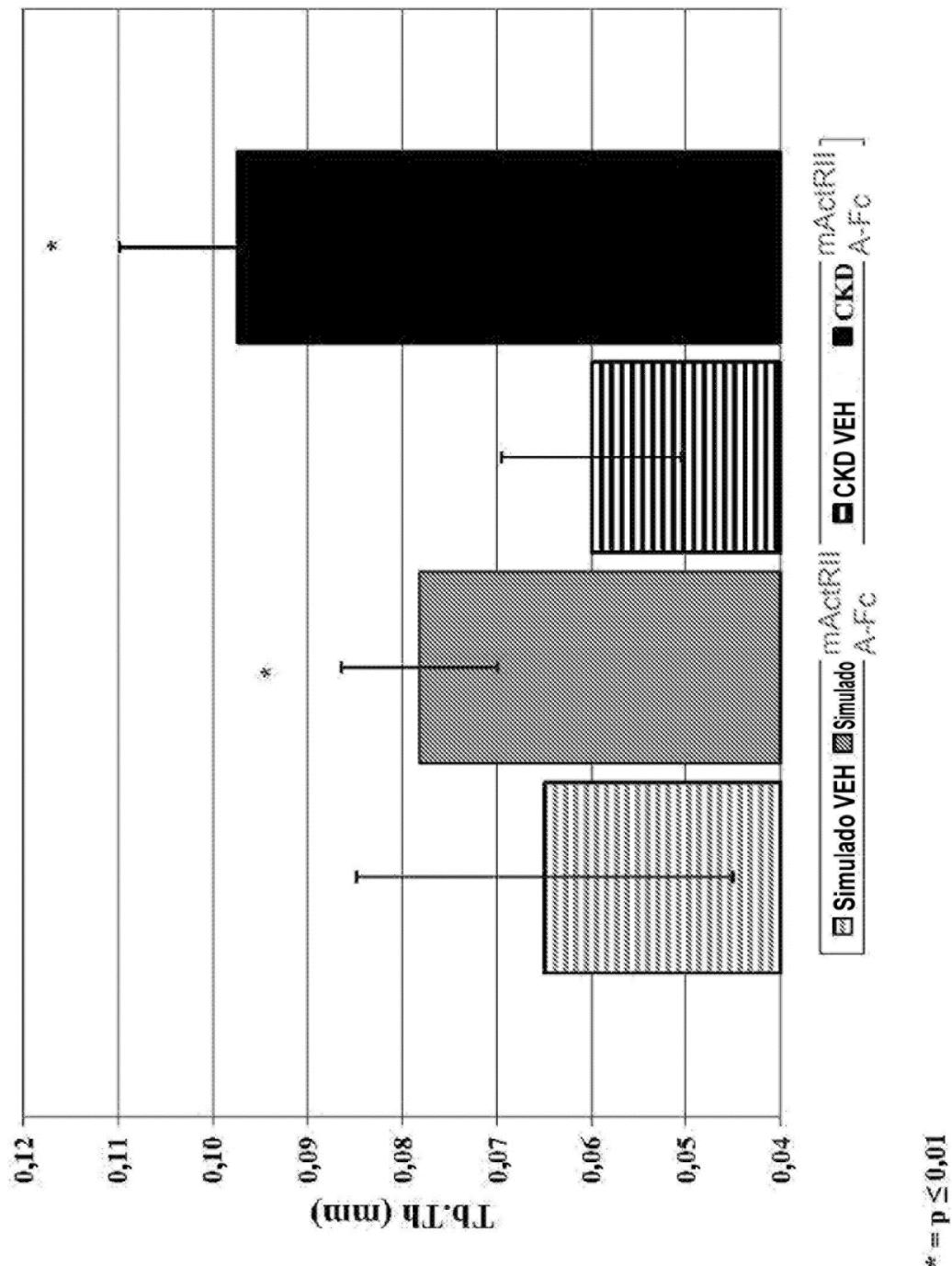


FIGURA 10

$* = p \leq 0,01$

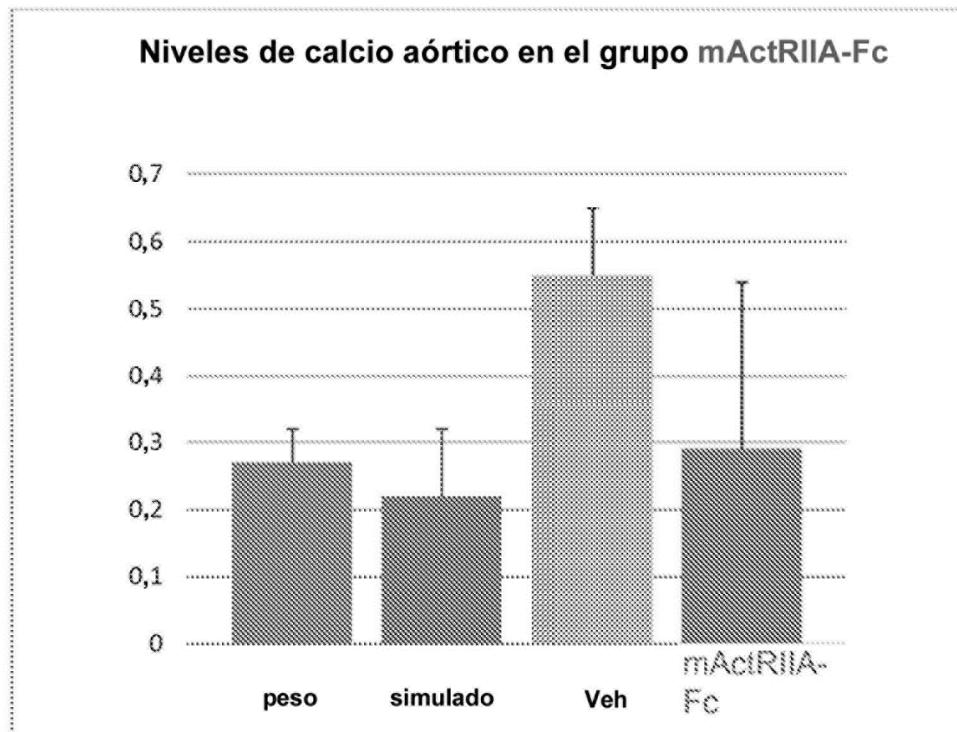


FIGURA 11