

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATROFIA MUSCULAR Y ENFERMEDAD ÓSEA CON EL USO DE PROTEÍNAS TRAP HÍBRIDAS NOVEDOSAS DEL LIGANDO ACTRIIB

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/410,595, presentada el 20 de octubre de 2016, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Antecedentes en la técnica

- 10 «Atrofia muscular» hace referencia a la pérdida progresiva de la masa muscular y/o a la debilidad y degeneración progresiva de los músculos, inclusive músculos esqueléticos o voluntarios, músculos cardíacos que controlan el corazón (cardiomiopatías) y músculos lisos. La atrofia muscular crónica es una afección (es decir, que persiste durante un período prolongado de tiempo) que se caracteriza por la pérdida progresiva de masa muscular, así como la debilidad y la degeneración muscular. La pérdida de masa muscular se da cuando la velocidad de degradación de las proteínas musculares
15 supera a la síntesis de las proteínas musculares.

- La atrofia muscular es una condición de enfermedad debilitante y mortal, que se ha asociado con el desarrollo de una cantidad de patologías crónicas, neurológicas, genéticas, inflamatorias, fibróticas o infecciosas, inclusive, por ejemplo, distrofias musculares, esclerosis lateral amiotrófica, miositis, atrofas por denervación muscular, síndrome de anorexia-caquexia, cánceres, artritis reumatoide,
20 osteoartritis, resistencia a la insulina/diabetes, obesidad sarcopénica, sarcopenia relacionada con la edad, privación de andrógenos, miopatía por corticosteroides, enfermedad intestinal inflamatoria, cirrosis hepática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, enfermedad renal crónica, traumatismos, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca crónica e infección por VIH. Otras afecciones que se dicen que generan atrofia muscular incluyen dolor lumbar crónico, edad
25 avanzada, daño en el sistema nervioso central, lesiones del nervio periférico, lesiones químicas, quemaduras a gran escala, remplazo de cadera/rodilla, atrofia por desuso, exposición a microgravedad y hospitalización por período prolongado.

- Se considera enfermedad ósea cualquier aflicción que implique el sistema esquelético. La enfermedad ósea puede ser muy seria y necesitar un tratamiento rápido y eficaz. Las enfermedades
30 óseas pueden ser muy dolorosas y pueden quitar al paciente movilidad e independencia. Si bien los factores causales varían según la enfermedad, muchas enfermedades óseas son generadas, por ejemplo, por factores genéticos, infección viral, anomalías químicas, falta de colágeno en los huesos, lesiones, fracturas, daño en los vasos sanguíneos, abuso del alcohol o el uso prolongado de determinados medicamentos. Los ejemplos de enfermedad ósea incluyen osteoporosis,
35 osteomalacia, osteogénesis imperfecta, displasia fibrosa, osificante progresiva, pérdida ósea

inducida por corticosteroides, fracturas óseas, metástasis de hueso y enfermedad ósea de Paget.

El receptor de activina IIA (ActRIIA) y el receptor de activina IIB (ActRIIB) son receptores del tipo II para un subconjunto de ligandos de la familia de TGF- β , inclusive, por ejemplo, la activina A, miostatina (también conocida como GDF-8), el factor de diferenciación de crecimiento 11 (GDF-11) y diversas proteínas morfogenéticas óseas (BMP, por sus siglas en inglés) tales como BMP-3, BMP-6, BMP-9 (también conocidas como GDF-2) y BMP-10. ActRIIA y ActRIIB fueron identificados como los receptores de tipo II para las activinas, inclusive activina A, activina B y activina AB. ActRIIB es un receptor de afinidad alta por la miostatina, un regulador negativo fundamental del crecimiento muscular, y por tanto tiene un papel central en el control de la masa muscular. La unión de estos ligandos a ActRIIA y/o ActRIIB puede regular la diferenciación celular, apoptosis, síntesis proteica y degradación, mineralización, hematopoyesis, angiogénesis, síntesis de esteroides, adhesión, migración, producción de matriz extracelular y fibrogénesis. La respuesta específica depende de los tipos y niveles de los ligandos y receptores de TGF- β así como el estado y entorno celular. La vía de señalización de ActRIIB media las respuestas celulares mediante factores de transcripción Smad2/3, y la activación de la vía de señalización de ActRIIB se ha visto implicada en la patogénesis y el avance de muchas enfermedades, inclusive atrofia muscular, pérdida ósea, fibrosis e inflamación. Varios miembros de la familia de TGF- β , inclusive la miostatina, activinas y GDF11, median la activación de Smad2/3 mediante acoplamiento a ActRIIB.

Se ha demostrado en estudios anteriores que la captura farmacológica de estos ligandos con ActRIIB-Fc conduce a un crecimiento muscular profundo y anabolismo óseo en modelos animales, lo que demuestra alrededor de tres veces más crecimiento muscular que los anticuerpos que neutralizan miostatina en ratones normales y demuestra la capacidad de estimular adicionalmente un aumento de músculo significativo en ratones sin miostatina (Chiu et ál., J Gerontol A Biol Sci Med Sci., 68(10):1181-92, octubre de 2013; Arounleut et ál., Exp Gerontol., 48(9): 898–904, setiembre de 2013). Y además de sus evidentes efectos anabólicos en el músculo y el hueso, también se ha demostrado que ActRIIB-Fc tiene importantes efectos antifibrosis y antiinflamatorios en modelos preclínicos y se han evaluado en forma clínica, o se están evaluando actualmente, varias proteínas de fusión ActRIIA-Fc y ActRIIB-Fc en pacientes para el tratamiento de trastornos relacionados con la atrofia muscular y/o enfermedades óseas asociadas al desarrollo de una cantidad de patologías crónicas, neurológicas, genéticas, inflamatorias, fibróticas o infecciosas. Por ejemplo, se evaluó en forma clínica ACE-011 de Acceleron Pharma, una fusión ActRIIA-Fc (Ph1, Ph2a) en pacientes con lesiones osteolíticas de mieloma múltiple y osteoporosis y se está evaluando actualmente para la anemia inducida por quimioterapia (CIA, por sus siglas en inglés) en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico (NSCLC, por sus siglas en inglés) (Ph2/3) (ClinicalTrials.gov) y para enfermedad renal terminal en pacientes con hemodiálisis y ACE-031 de Acceleron Pharma,

una proteína de fusión ActRIIB-Fc que se ha evaluado en forma clínica (Ph1, Ph2) por su eficacia terapéutica en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) (ClinicalTrials.gov).

Lamentablemente, si bien parece eficaz, el potencial clínico de ACE-011 para el tratamiento de la osteoporosis se vio obstaculizado por preocupaciones en cuanto a la seguridad (crecimiento elevado de RBC) y, si bien ACE-031 demostró un aumento muscular significativo que fue más pronunciado que el generado por un inhibidor selectivo de la miostatina, tal como un anticuerpo, peptidocuerpo o propéptido de miostatina, se vio obstaculizado por eventos adversos de sangrados de encías y nariz que se observó en pacientes con DMD, por lo tanto se ordenó la suspensión clínica de ACE-031 (Smith R.C. y Lin B.K., Curr Opin Support Palliat Care. 7(4): 352–360, 2013). Por consiguiente, se discontinuó ACE-031 en ensayos de fase 2 de DMD debido a los efectos secundarios de sangrado de encías y nariz a pesar de las prometedoras señales de eficacia en la mejora de la masa y función muscular en pacientes con DMD. Por lo tanto, parece que ActRIIB-Fc de tipo salvaje es capaz de bloquear la señalización de Smad1/3/8 mediada por BMP9 que es fundamental para mantener la homeostasis de los vasos sanguíneos, y se cree que este bloqueo funcional de BMP9 con el ActRIIB de tipo salvaje es la causa subyacente del efecto secundario de sangrados, ya que nuevas pruebas genéticas convincentes han vinculado las mutaciones de pérdida de función de BMP9 con síndrome de anomalía vascular y hemorragia en seres humanos (Wooderchak-Donahue et. ál., Am J Hum Genet., 93(3): 530–537, setiembre de 2013).

De modo que, si bien han habido importantes avances, todavía existe una gran necesidad de proporcionar terapéuticos novedosos, que sean tanto altamente eficaces como seguros, para el tratamiento de la atrofia muscular y/o enfermedad ósea que se asocia con el desarrollo de una cantidad de patologías crónicas, neurológicas, genéticas, inflamatorias, fibróticas o infecciosas.

Incorporación mediante referencia

Todas las referencias descritas en la presente se incorporan en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

Descripción de la invención

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde tal administración atenúa la pérdida de masa muscular y/o la pérdida de función muscular. En varias modalidades, la atrofia muscular se asocia con una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en: distrofias musculares (tales como DMD, DM de Becker, DM de Limb-Girdle, DM miotónica y FSHD), miositis (tal como dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión), miopatía (inclusive miopatía heredada así como

miopatía adquirida tal como miopatía inducida por terapia de privación de andrógenos, corticosteroides o estatinas), enfermedad de la motoneurona (tal como enfermedad de Lou Gehrig o ALS), atrofia muscular espinal (inclusive atrofia muscular espinal progresiva infantil, atrofia muscular espinal intermedia, atrofia muscular espinal juvenil y atrofia muscular espinal en adultos),
 5 enfermedad de la unión neuromuscular (tal como miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton y botulismo), enfermedad del nervio periférico (tal como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Dejerine-Sottas y ataxia de Friedreich), lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas (inclusive enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), cáncer
 10 (tal como cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de cuello y cabeza, cáncer de ovario, rabdomiosarcoma, glioma, neuroblastoma, linfoma y mieloma múltiple, cáncer de piel y cáncer sanguíneo), insuficiencia orgánica (tal como insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal e insuficiencia hepática, traumatismos (tales como quemaduras o accidentes en motocicletas), desuso (tal como
 15 reposo prolongado, hospitalización y vuelos espaciales), infección (tal como VIH, polio y sepsis), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y envejecimiento (tal como sarcopenia, obesidad sarcopénica y osteoartritis).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad ósea en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad
 20 terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad ósea se selecciona del grupo que consiste en: osteoporosis, osteodistrofia renal, osteogénesis imperfecta, fibrodisplasia osificante progresiva, pérdida ósea inducida por corticosteroides, pérdida ósea inducida por terapia de
 25 privación de andrógenos, fractura de cadera, pérdida ósea inducida por cáncer, metástasis ósea, enfermedad de Paget, Rickets, osteomalacia, enfermedad de Perthes y displasia fibrosa.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno metabólico en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de
 30 una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en: síndrome metabólico, obesidad, dislipidemia, obesidad sarcopénica, enfermedad de hígado graso no alcohólica tal como esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), enfermedad de hígado graso alcohólica, resistencia a la insulina, diabetes así como
 35 miopatía diabética, nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética y

hemocromatosis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la fibrosis en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, fibrosis hepática, cirrosis, atresia biliar, infarto de miocardio, fibrosis cardíaca, fibrosis renal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, dermatopatía fibrosante nefrogénica, enfermedad intestinal inflamatoria o enfermedad de Crohn, queloide, escleroderma, fibrosis retroperitoneal y artrofibrosis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune/inflamatoria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: trastornos autoinmunes/inflamatorios, inclusive esclerosis múltiple (EM), esclerosis sistémica, diabetes (tipo 1), glomerulonefritis, miastenia gravis, psoriasis, lupus sistémico eritematoso, polimiositis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y cirrosis biliar primaria, artritis, asma y sepsis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en: insuficiencia cardíaca, atrofia cardíaca, hipertensión arterial pulmonar (PAH, por sus siglas en inglés), miocarditis, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, valvulopatía cardíaca, cardiomiopatía, enfermedad pericárdica, enfermedad de la aorta, síndrome de Marfan y trasplante cardíaco.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de cáncer o metástasis del cáncer en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, hepatoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de

cuello y cabeza, rhabdomyosarcoma, glioma, neuroblastoma, mieloma, linfoma y leucemia, melanoma, carcinoma y síndrome mielodisplásico.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la enfermedad renal crónica (CKD, por sus siglas en inglés) en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la CKD se selecciona del grupo que consiste en: CKD inclusive insuficiencia renal, fibrosis intersticial, nefropatía diabética, diálisis renal, osteodistrofia renal y desgaste proteico energético (PEW, por sus siglas en inglés).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la artritis en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En diversas modalidades, la artritis se selecciona del grupo que consiste en: artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de Still, espondilitis anquilosante, dolor de espalda, enfermedad de Behçet, bursitis, enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio, síndrome del túnel carpiano, condromalacia rotuliana, síndrome de fatiga crónica, síndrome de dolor regional complejo, síndrome periódico asociado a la criopirina, enfermedad degenerativa del disco, displasia del desarrollo de la cadera, síndrome de Ehlers-Danlos, fiebre mediterránea familiar, fibromialgia, arteritis de células gigantes, dermatomiositis, artritis idiopática, escleroderma, enfermedad de Kawasaki, lupus, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, polimiositis, Paget, enfermedades reumáticas, hemocromatosis, artritis infecciosa, artritis psoriásica, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, enfermedad de Sjögren, estenosis espinal y tendinitis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la anorexia en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En diversas modalidades, la anorexia se selecciona de anorexia nerviosa y síndrome de anorexia-caquexia.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad hepática en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad hepática se

selecciona del grupo que consiste en esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática o cirrosis, cirrosis, hepatitis autoinmune, carcinoma hepatocelular, insuficiencia hepática y trasplante de hígado.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el trasplante de órganos o tejidos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, el trasplante se selecciona del grupo que consiste en: trasplante de órganos de corazón, riñones, hígado, pulmones, páncreas, intestino y timo o de trasplantes tisulares/celulares de músculos, huesos, tendones, córneas, piel, válvulas cardíacas, nervios y venas.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la anemia en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la anemia se selecciona del grupo que consiste en: anemia de inflamación, anemia por deficiencia de hierro, exceso de hierro, talasemia, anemia hemolítica, anemia drepanocítica, anemia perniciosa, anemia de Fanconi, síndrome mielodisplásico, anemia aplásica, anemia asociada con cáncer, anemia inducida por quimioterapia y anemia asociada a CKD y diálisis renal.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del dolor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, el dolor se selecciona del grupo que consiste en: dolor neuropático, dolor somático, dolor visceral, dolor inflamatorio, dolor por cáncer, dolor de espalda y dolor de articulaciones.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del envejecimiento en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la afección del envejecimiento se selecciona del grupo que consiste en: fragilidad del adulto mayor, sarcopenia relacionada con la edad y osteoartritis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para inducir el crecimiento de células madre para la reparación de tejidos o regeneración de órganos en un sujeto, que comprende la

administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap del ligando de ActRIIB híbrida de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la célula madre se selecciona del grupo que consiste en: célula madre muscular (satélite), célula madre

cardíaca, célula madre mesenquimal derivada de médula ósea y célula madre pluripotente. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos uno de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido, y en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto a un polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje.

En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprende polipéptidos ActRIIB-ECD solubles híbridos que tienen la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, los polipéptidos ActRIIB solubles híbridos son polipéptidos ActRIIB solubles híbridos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 3-37, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ

ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 o SEQ ID NO: 117, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, los polipéptidos ActRIIB solubles híbridos son polipéptidos ActRIIB solubles híbridos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 51-117, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje.

En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB de la presente descripción comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble y al menos una proteína heteróloga, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, la proteína heteróloga es un dominio Fc. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana. En varias modalidades, el dominio Fc deriva de la secuencia de dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana que se establece en la SEQ ID NO: 38. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 39. En varias modalidades, el dominio Fc deriva de la secuencia de dominio constante de cadena pesada de IgG2 humana que se establece en la SEQ ID NO: 40. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 41. En varias modalidades, el dominio Fc deriva de la secuencia de dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana que se establece en la SEQ ID NO: 42. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 43.

En varias modalidades, la proteína heteróloga se une al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble mediante un enlazador y/o péptido enlazador bisagra. El enlazador o enlazador bisagra puede ser una secuencia artificial de entre 5, 10, 15, 20, 30, 40 o más aminoácidos que carecen relativamente de una estructura secundaria. . En varias modalidades, el enlazador es rico en contenido G/S (por ejemplo, al menos alrededor de 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los aminoácidos en el enlazador son G o S. En varias modalidades, el enlazador tiene un motivo (GGGGS (SEQ ID NO: 44))_n, en donde n = 1-6.

En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) a un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117)

de la presente descripción.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra dos configuraciones moleculares ilustrativas para las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB de la presente descripción.

La Figura 2 muestra gráficas de líneas que ilustran los resultados de los ensayos celulares usados para evaluar las capacidades de neutralización de la miostatina (paneles izquierdos), de neutralización de la activina A (paneles del medio) y de neutralización de BMP9 (paneles derechos) para la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB que tiene la secuencia de aminoácidos de AG-0003 (SEQ ID NO: 5) y la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB que tiene la secuencia de aminoácidos de AG-0005 (SEQ ID NO: 7), en comparación con las de la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje como referencia (WT, por sus siglas en inglés).

La Figura 3 muestra gráficas de líneas que ilustran los resultados de actividades de neutralización celulares en miostatina (superior izquierdo), activina A (superior derecho), activina B (inferior izquierdo) y BMP9 (inferior derecho) para la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB que tiene la secuencia de aminoácidos de AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB que tiene la secuencia de aminoácidos de AG-0027 (SEQ ID NO: 29) en comparación con las de la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje como referencia (WT). Se evaluaron las actividades neutralizantes de miostatina, activina A y activina B mediante el uso de un ensayo informante de C2C12-CAGA-luc y se analizaron las actividades neutralizantes de BMP9 con el uso de un ensayo informante de C2C12-BRE-luc tal como se describe en los Ejemplos.

La Figura 4 muestra gráficas de líneas que ilustran los efectos en el peso corporal en ratones macho C57Bl/6 de 9 semanas a los que se inyectó en forma subcutánea con PBS (vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a una dosificación de 10 mg/kg, una vez por semana. Se registró el peso corporal en el día 0, el día 5, el día 12 y el día 18. n=6/8 por grupo. Se llevó a cabo la prueba t de Student para análisis estadístico.

***: P<0.001 en oposición al grupo vehículo.

La Figura 5 es una gráfica de barras que ilustra los efectos en la masa muscular en ratones macho C57Bl/6 de 9 semanas a los que se inyectó en forma subcutánea con PBS (vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a la dosificación de 10 mg/kg, una vez por semana (n=6/8 por grupo). Se realizó disección a los músculos de la pantorrilla de cada animal y se pesaron durante la necropsia terminal. Se llevó a cabo un

análisis estadístico mediante prueba t de Student. ***: $P < 0.001$ en oposición al grupo vehículo.

La Figura 6 muestra imágenes de la prueba de permeabilidad vascular con Evans Blue de la cavidad abdominal de ratones. Las imágenes representativas de la cavidad abdominal expuesta con cirugía de cada grupo se muestran tal como se etiqueta en la figura. Se trató a ratones macho BalbC de 8 semanas con PBS (vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a una dosificación de 10 mg/kg, una vez por semana. Dos semanas después del tratamiento, se inyectaron 200 μ l de tinte Evans Blue (0.5 % en PBS, pH 7.2) en cada grupo de animales (n=4) mediante la vena de la cola. Se llevó a cabo una necropsia 90 min después de la inyección del tinte Evans Blue.

La Figura 7 muestra imágenes de la prueba de permeabilidad vascular con Evans Blue de los testículos de los ratones. Las imágenes representativas de los órganos testículos disecados de cada grupo se muestran tal como se etiqueta en la figura. Se trató a ratones macho BalbC de 8 semanas con PBS (vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a 10 mg/kg, una vez a la semana. Dos semanas después del tratamiento, se inyectaron 200 μ l de tinte Evans Blue (0.5 % en PBS, pH 7.2) en cada grupo de animales (n=4) mediante la vena de la cola. Se llevó a cabo una necropsia 90 min luego de la inyección del tinte Evans Blue.

La Figura 8 muestra imágenes de la prueba de permeabilidad vascular con Evans Blue de los pulmones de los ratones. Las imágenes representativas de los tejidos pulmonares disecados de cada grupo se muestran tal como se etiqueta en la figura. Se trató a ratones macho BalbC de 8 semanas con PBS (vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a 10 mg/kg, una vez a la semana. Dos semanas después del tratamiento, se inyectaron 200 μ l de tinte Evans Blue (0.5 % en PBS, pH 7.2) en cada grupo de animales (n=4) mediante la vena de la cola. Se llevó a cabo una necropsia 90 min después de la inyección del tinte Evans Blue.

La Figura 9 muestra gráficas de barras que ilustran las cantidades de tinte Evans Blue extravasado por mg de tejido pulmonar húmedo (panel izquierdo) y tejido de testículo (panel derecho) en diferentes grupos de tratamiento tal como se etiqueta en la figura. Se trató a ratones macho BalbC de 8 semanas con PBS (vehículo), la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a 10 mg/kg, una vez a la semana. Dos semanas después del tratamiento, se inyectaron 200 μ l de tinte Evans Blue (0.5 % en PBS, pH 7.2) en cada grupo de animales (n=4) mediante la vena de la cola. Se llevó a cabo la necropsia 90 min después de la inyección del tinte Evans Blue para recolectar los tejidos de testículo y pulmón. Se pesaron los tejidos y luego se colocaron en forma individual en viales que contenían formamida para extraer el tinte Evans Blue. Luego de la incubación a 55 °C durante 24 horas, se centrifugaron las

muestras y se midió la absorbancia de la fase acuosa de cada muestra a la longitud de onda de 610 nm con un espectrofotómetro. Se llevó a cabo un análisis estadístico con el uso de la prueba t de Student. *: $P < 0.05$.

La Figura 10 muestra gráficas de líneas que ilustran los resultados de las actividades neutralizantes celulares en BMP9 para una cantidad de proteínas trap híbridas ilustrativas del ligando ActRIIB que incluyen AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0025 (SEQ ID NO: 27), AG-0027 (SEQ ID NO: 29), AG-0028 (SEQ ID NO: 30), AG-0029 (SEQ ID NO: 31) y AG-0035 (SEQ ID NO: 37) en comparación con las de la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje como referencia (tipo salvaje). Se analizaron las actividades neutralizantes de BMP9 mediante el uso de un ensayo informante de C2C12-BRE-luc.

La Figura 11 ilustra las diferencias en los valores IC₅₀ de neutralización de miostatina entre varias proteínas trap híbridas ilustrativas del ligando ActRIIB con respecto a los de la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje. Se evaluaron las actividades de neutralización de miostatina de las proteínas individuales con el uso de cultivos informantes C2C12- CAGA-luc y se calcularon los valores IC₅₀ mediante el uso del software Prism. La gráfica muestra el porcentaje de diferencia en el valor IC₅₀ de neutralización de miostatina de cada una de las proteínas trap híbridas ilustrativas del ligando ActRIIB, inclusive AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0027 (SEQ ID NO: 29), AG-0028 (SEQ ID NO: 30) y AG-0029 (SEQ ID NO: 31), en comparación con el de ActRIIB-Fc de tipo salvaje.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis ELISA en la unión a BMP9 de dos proteínas trap híbridas ilustrativas del ligando ActRIIB AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, en comparación con ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT) así como ActRIIA-Fc de tipo salvaje a concentraciones crecientes. Se llevó a cabo ELISA automático con un instrumento KinEXA (Sapidyne Instruments). Se acoplaron 20 µg/ml de BMP9 a perlas Sepharose 4 Fast Flow activadas con NHS (GE Healthcare) utilizando el procedimiento experimental recomendado por Sapidyne Instruments. Se evaluaron WT ActRIIB-Fc, WT ActRIIA-Fc y cada proteína trap híbrida del ligando ActRIIB para determinar la unión a BMP9 a concentraciones de 100 pM, 1 nM y 10 nM tal como se muestra en la figura. Las proteínas de tipo salvaje e híbridas fueron capturadas en las perlas recubiertas con BMP9 y se detectaron mediante el anticuerpo antihumano Fc de cabra marcado con Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Se registraron las señales de unión a BMP9 con el software KinExA Pro (Sapidyne Instruments).

La Figura 13 muestra una evaluación microscópica en la morfología general del lecho ungueal de la pata trasera de ratones 129S1/SvImJ tratados con PBS (vehículo testigo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT-ActRIIB-Fc), Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) o Trap B híbrida (AG-0014; SEQ ID NO: 16). Se inspeccionaron los lechos ungueales de patas traseras en busca de señales de sangrado

mediante el uso de un microscopio invertido y se fotografió con una cámara digital.

La Figura 14 muestra gráficas de líneas que ilustran el efecto de la administración de Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) en el peso corporal en ratones ORX C57BL/6. Los datos ilustran los pesos corporales registrados en forma longitudinal (panel izquierdo) y los cambios en el peso corporal (panel derecho) en un grupo testigo normal, un grupo ORX tratado con vehículo y un grupo ORX tratado con Trap híbrida. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P < 0.001$ en oposición al grupo ORX tratado con vehículo. $n = 6$.

La Figura 15 muestra gráficas de barras que ilustran el efecto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (AG-0027; SEQ ID NO: 29) en la masa muscular de las patas traseras y la masa magra esquelética en ratones con orquiectomía (ORX). Se registraron los pesos de los músculos gastrocnemio, cuádriceps y sóleo y los pesos magros esqueléticos durante la necropsia terminal en el día 42 para el grupo testigo normal, el grupo ORX tratado con vehículo y el grupo ORX tratado con la trap híbrida del ligando ActRIIB. Los datos de los promedios de pesos de los músculos gastrocnemio, cuádriceps y sóleo se basaron en cada par de músculos de las patas traseras. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P < 0.001$. $n = 6$.

La Figura 16 muestra gráficas de barras que ilustran un análisis microCT de la fracción del volumen óseo (BV/TV, %), el grosor trabecular (Tb.Th, mm), el número trabecular (Tb.N, mm^{-1}) y la separación trabecular (Tb.Sp, mm) del fémur distal en ratones normales (normal), ratones ORX tratados con vehículo (ORX + vehículo) y ratones ORX tratados con trap híbrida del ligando ActRIIB (AG-0027; SEQ ID NO: 29) (ORX + trap híbrida). Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. $n = 6$.

La Figura 17 muestra gráficas de barras que ilustran un análisis MicroCT de la fracción del volumen óseo (BV/TV, %), el grosor trabecular (Tb.Th, mm), el número trabecular (Tb.N, mm^{-1}) y la separación trabecular (Tb.Sp, mm) de la 4^o vértebra lumbar en ratones normales (normal), ratones ORX tratados con vehículo (ORX + vehículo) y ratones ORX tratados con la trap híbrida del ligando ActRIIB (AG-0027; SEQ ID NO: 29) (ORX + trap híbrida). Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. $n = 6$.

La Figura 18 muestra gráficas de barras que ilustran el efecto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (AG-0027; SEQ ID NO: 29) en la ingesta de alimentos (A), el consumo de agua (B), el volumen de orina en 24 horas (C) y el nivel de glucosa en sangre en ayuno (D) en ratones db/db diabéticos. Se utilizan ratones db/db heterocigotas ($n = 6$) como testigos no diabéticos. Se midieron la ingesta de alimentos, el consumo de agua, el volumen de orina en 24 horas y el nivel de glucosa en sangre en ayuno luego de 10 semanas de tratamiento. Se lleva a cabo un análisis estadístico mediante prueba t de Student. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. $n = 6$ por grupo.

La Figura 19 muestra el efecto de una única dosis de proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB

(Trap híbrida) en los cambios de peso corporal en ratones hembra C57BL/6. Se trataron de manera subcutánea ratones hembra C57BL/6 de siete semanas (n=6 por grupo) con una única inyección de Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29), Trap B híbrida (AG-0014; SEQ ID NO: 16) y ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT-ActRIIB-Fc) a 10 mg/kg, respectivamente. El grupo testigo recibió una única inyección de vehículo (PBS). Se registraron el peso corporal (A) y los cambios en el peso corporal respecto a la referencia (B) en ratones tratados con PBS y con Trap híbrida en diferentes momentos hasta los 14 días posinyección. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P < 0.001$; n=6 por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 20 muestra la comparación directa de los efectos de una única inyección de proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la masa muscular de las patas traseras y la masa magra esquelética en ratones C57BL/6. Se trató a los ratones de manera subcutánea con una única dosis, a 10 mg/kg, de Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29), Trap B híbrida (AG-0014; SEQ ID NO: 16) y WT-ActRIIB-Fc (referencia), respectivamente, o con vehículo (PBS). En el día 14 luego de la inyección, se sometió a los ratones a necropsia terminal. Se determinaron los pesos de los músculos de las patas traseras, inclusive el gastrocnemio (A), el cuádriceps (B) y el sóleo (C), y los pesos magros esqueléticos (D) para grupos tratados con PBS, Trap A híbrida y Trap B híbrida. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P < 0.001$; n=6 por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student.

La Figura 21 muestra el efecto de dosis individuales en aumento de proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en los cambios de peso corporal en ratones hembra C57BL/6. Se trataron de manera subcutánea ratones hembra C57BL/6 de seis semanas con dosis individuales en aumento de Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) y Trap B híbrida (AG-0014 (SEQ ID NO: 16) a 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se trató el grupo testigo con vehículo (PBS). Se registraron el peso corporal y el cambio en el peso corporal respecto a la referencia en ratones tratados con PBS y tratados con Trap híbrida hasta los 8 días posinyección. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n=6 por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 22 ilustra el efecto de dosis individuales en aumento de proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la masa muscular de las patas traseras en ratones hembra C57BL/6. Se administró Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) y Trap B híbrida (AG-0014 (SEQ ID NO: 16) en forma subcutánea a 1mg/kg, 3mg/kg y 10mg/kg, respectivamente. En el día 8, se practicó una eutanasia a los ratones para la necropsia terminal. Se determinaron los pesos de los músculos de las patas traseras, inclusive el gastrocnemio (A) y el cuádriceps (B) mediante procedimientos de necropsia para grupos tratados con PBS, Trap A híbrida y Trap B híbrida. Se llevaron a cabo los

análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; $n=6$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student.

La Figura 23 muestra el efecto de dosis individuales en aumento de la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la ingesta de alimentos en ratones hembra C57BL/6. Se trataron ratones hembra C57BL/6 de seis semanas con dosis individuales en aumento de Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29), SC, a 1mg/kg, 3mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Los datos ilustran la ingesta de alimentos registrada en el día 8 en ratones tratados con PBS y tratados con Trap híbrida. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. **: $P<0.01$; $n=6$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 24 ilustra el efecto de la administración subcutánea de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en el peso corporal en ratones con distrofia muscular de Duchenne (MDX). Se trataron ratones MDX de cuatro semanas con vehículo (PBS) o con Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) o con Trap B híbrida (AG-0014 (SEQ ID NO: 16), SC, a 10 mg/kg, una vez a la semana, durante ocho semanas. Los datos muestran el registro en forma longitudinal del peso corporal (A) y el cambio en el peso corporal respecto a la referencia (B) en ratones MDX tratados con PBS y Trap híbrida. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P<0.001$; $n=8$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 25 muestra el efecto de la administración subcutánea de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la masa muscular de las patas traseras en ratones MDX. Se trataron de manera subcutánea ratones MDX con Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) y Trap B híbrida (AG-0014 (SEQ ID NO: 16) a 10mg/kg, una vez por semana o con vehículo (PBS) durante 8 semanas. En el día 56, se practicó una eutanasia a los ratones MDX para necropsia terminal. Los pesos de los músculos de las patas traseras individuales, inclusive el gastrocnemio (A), el cuádriceps (B) y el sóleo (C) se determinaron mediante procedimientos de necropsia en ratones MDX tratados con PBS (MDX + PBS) o con Trap A híbrida (MDX + Trap A híbrida) o con Trap B híbrida (MDX + Trap B híbrida). Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P<0.001$; $n=8$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 26 muestra el efecto de la administración subcutánea de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la fuerza de agarre en ratones MDX. Se analizó la fuerza de agarre en la semana 8 en ratones MDX tratados con PBS (MDX + PBS) o con Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) (MDX + Trap A híbrida) o Trap B híbrida (MDX + Trap B híbrida) (AG-0014 (SEQ ID NO: 16) mediante el uso de un medidor de fuerza de agarre BIOSEB (EB-instruments). Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. ***: $P<0.001$; $n=8$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 27 ilustra el efecto de la administración subcutánea de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en los niveles de creatina cinasa (CK, por sus siglas en inglés) en circulación en ratones MDX. Se trataron ratones MDX con PBS o con Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) a 10mg/kg, SC, semanalmente, durante 8 semanas. Se usaron ratones tipo salvaje de la misma edad como testigo normal. Se midieron los niveles de CK en suero en ratones de tipo salvaje (WT) de la misma edad y en ratones MDX tratados con PBS (MDX + PBS) o Trap híbrida (Trap híbrida + PBS). *: $P < 0.05$, prueba t de Student. $n = 8$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 28 muestra los resultados de análisis micro-CT de los cambios en la densidad ósea trabecular en el fémur distal producto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida). Se trataron ratones MDX con PBS (MDX + PBS) o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) (MDX + Trap híbrida) a 10mg/kg, SC, semanalmente, durante 8 semanas. A. Volumen óseo (BV/TV, %) del fémur distal en grupos tratados con PBS y con Trap híbrida. Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico. ***: $P < 0.001$. $n = 8$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar. B. Imágenes representativas de la arquitectura trabecular del fémur distal de grupos tratados con PBS y Trap híbrida.

La Figura 29 muestra los resultados de análisis micro-CT de los cambios en la densidad ósea trabecular en la columna lumbar producto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida). Se trataron ratones MDX con PBS (MDX + PBS) o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) (MDX + Trap híbrida) a 10mg/kg, SC, semanalmente, durante 8 semanas. A. Volumen óseo (BV/TV, %) de la columna lumbar en grupos tratados con PBS y con Trap híbrida. Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico. ***: $P < 0.001$. $n = 8$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar. B. Imágenes representativas de la arquitectura trabecular de la columna lumbar de grupos tratados con PBS y Trap híbrida.

La Figura 30 muestra el efecto de trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la masa muscular en ratones de tipo salvaje y oim/oim (osteogéneses imperfecta tipo III). Se trataron ratones testigo de tipo salvaje y ratones oim/oim de ocho semanas con PBS o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) durante 6 semanas. Se registraron los pesos de los tríceps (A) y el músculo gastrocnemio (B) durante la necropsia terminal. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. $n = 9-12$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 31 muestra los resultados del análisis de absorciometría de rayos X con doble energía (DEXA) de los cambios en BMD y BMC en ratones de tipo salvaje y oim/oim producto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida). Se trataron ratones testigo de tipo salvaje y ratones oim/oim de ocho semanas con PBS o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) durante 6

semanas. Se llevaron a cabo escaneos DEXA en BMD (A) y BMC (B) inmediatamente antes y después del tratamiento de 6 semanas con PBS o Trap híbrida. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. $n = 9-12$ por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

- 5 La Figura 32 muestra los resultados de análisis micro-CT de los cambios en la densidad ósea trabecular en el fémur distal producto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida). Se trataron ratones testigo de tipo salvaje y ratones oim/oim de ocho semanas con PBS o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) durante 6 semanas. Los datos ilustran un volumen de fractura ósea (BV/TV %) así como las imágenes de microCT representativas de arquitectura trabecular en el fémur distal en ratones de tipo salvaje tratados con PBS y Trap híbrida y en ratones de tipo salvaje (panel A) y ratones oim/oim (panel B) tratados con PBS y Trap híbrida. Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar.

- 15 La Figura 33 muestra los resultados de análisis micro-CT de los cambios en la densidad ósea trabecular en la columna lumbar producto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida). Los datos ilustran el volumen de fractura ósea (BV/TV %) así como imágenes de microCT representativas de la arquitectura trabecular en la 5° vértebra lumbar en ratones de tipo salvaje (panel A) y ratones oim/oim (panel B) tratados con PBS o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29). Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar.

- 20 La Figura 34 ilustra el efecto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la longitud del cuerpo en ratones oim/oim. Se midieron las longitudes corporales de los ratones oim/oim y ratones testigo de tipo salvaje de la misma edad luego del tratamiento de 6 semanas con PBS o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29). A. Longitud corporal en ratones de tipo salvaje y oim/oim luego del tratamiento de 6 semanas. B. Longitud corporal graficada como el porcentaje de cambio respecto al testigo de tipo salvaje. Las barras de error representan la desviación estándar.

- La Figura 35 muestra los resultados del análisis de histomorfometría ósea del efecto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en el área del hueso (A), el perímetro del hueso (B) y la relación de la superficie de mineralización/superficie ósea (C) en los fémures distales. Se llevó a cabo un análisis de histomorfometría ósea luego del tratamiento de 6 semanas con PBS o Trap híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29).

- La Figura 36 muestra los resultados del análisis de histomorfometría ósea del efecto del tratamiento con trap híbrida del ligando ActRIIB (Trap híbrida) en la relación de osteoclastos/superficie ósea (A) y la relación de cantidad de osteoclastos/perímetro óseo (B) en los fémures distales. Se llevó a cabo un análisis de histomorfometría ósea luego del tratamiento de 6 semanas con PBS o Trap híbrida

(AG-0027; SEQ ID NO: 29).

Modos de llevar a cabo la Descripción

La presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de trastornos relacionados con la miostatina o relacionados con la activina A en un sujeto, que comprenden la administración a dicho

5 sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinado) de una trap híbrida del ligando ActRIIB aislada novedosa de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. Las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB aisladas novedosas se modifican genéticamente como proteínas de fusión que funcionan

10 como antagonista de múltiples citocinas diseñadas para bloquear en forma selectiva las acciones de múltiples citocinas caquéticas (inducción de atrofia) sin afectar la señalización de citocinas no relacionadas con músculos. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden polipéptidos ActRIIB-ECD solubles híbridos aislados que pueden unirse a la miostatina y la activina A, pero demuestran una baja afinidad de unión por BMP9 (es decir, conservan

15 actividades de neutralización de miostatina y activina A, pero demuestran una neutralización baja drástica de BMP9) con respecto a un polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. La presente descripción se basa en parte en la perspectiva única de los inventores de que una trap híbrida del ligando ActRIIB modificada para presentar una reducción significativa en la unión a BMP9 (lo que reduce por tanto la neutralización de BMP9), mientras que conserva su potente actividad neutralizante contra la miostatina y la activina, proporcionaría inhibidores de miostatina que son

20 moléculas más seguras y eficaces que los inhibidores de miostatina disponibles actualmente. Específicamente, los inventores postularon que un polipéptido híbrido ActRIIB soluble modificado para remplazar selectivamente los residuos de aminoácidos dentro del dominio extracelular ActRIIB (ECD, por sus siglas en inglés) con los correspondientes residuos de aminoácidos del ECD de ActRIIA podría proporcionar polipéptidos ActRIIB solubles híbridos novedosos que preferentemente

25 neutralizan la miostatina y activina A (los reguladores negativos clave de crecimiento muscular) respecto a BMP9. BMP9 cumple un importante papel en una cantidad de procesos fisiológicos (véase, por ejemplo, Tillet E, et ál., Front Genet. 8;5:456, 2015) y se ha demostrado que la señalización de BMP9 es esencial para mantener la vasculatura sanguínea/permeabilidad normal (véase, por ejemplo, David L., et ál., Circ Res. 25;102(8):914-22, 2008). Por tanto, se postula que

30 los sujetos tratados con las proteínas trap híbrida del ligando ActRIIB novedosas descritas en la presente pueden evitar los efectos secundarios de sangrado de encías y nariz que se observan en los sujetos tratados con las moléculas existentes de ActRIIB-Fc que se unen y neutralizan potentemente BMP9. Las ventajas terapéuticas que proporcionan estas proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB novedosas ofrecen terapéuticos de última generación que son seguros y eficaces

35 para revertir la pérdida muscular grave y caquexia y para el tratamiento de una amplia gama de

enfermedades crónicas catabólicas que implican la atrofia muscular, pérdida ósea, inflamación y fibrosis.

Definiciones

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. En varias modalidades, «péptidos», «polipéptidos» y «proteínas» son cadenas de aminoácidos cuyos carbonos alfa se enlazan mediante enlaces peptídicos. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (extremo amino) tiene por tanto un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (extremo carboxi) tiene un grupo carboxilo libre. Tal como se usa en la presente, la expresión «extremo amino» (que se abrevia extremo N) hace referencia al grupo libre α -amino en un aminoácido en el extremo amino de un péptido o al grupo α -amino (grupo imino cuando participa de un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. De manera similar, la expresión «extremo carboxi» hace referencia al grupo libre carboxilo en el extremo carboxi de un péptido o grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido.

Los péptidos también incluyen básicamente cualquier poliaminoácido que incluye, de modo no taxativo, miméticos peptídicos tales como aminoácidos unidos mediante un éter en oposición a un enlace amida.

Los polipéptidos de la descripción incluyen polipéptidos que se modificaron de cualquier modo y por cualquier motivo, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alterar las afinidades de unión y (5) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras) pueden hacerse en la secuencia de origen natural (por ejemplo, en la parte del polipéptido fuera de los dominios que forman contactos intermoleculares).

Una «sustitución de aminoácidos conservadora» hace referencia a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido con un aminoácido con una función similar. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) alanina (A), serina (S) y treonina (T)
- 2) ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E)
- 3) asparagina (N) y glutamina (Q)
- 4) arginina (R) y lisina (K)
- 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M) y valina (V)
- 6) fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W)

Una «sustitución de aminoácidos no conservadora» hace referencia a la sustitución con un elemento de una de estas clases por un elemento de otra clase. Al hacer tales cambios, de acuerdo

con varias modalidades, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le otorgó un índice hidropático conforme a sus características de carga e hidrofobicidad. Estos son: isoleucina (+4.5), valina (+4.2), leucina (+3.8), fenilalanina (+2.8), cisteína/cistina (+2.5), metionina (+1.9), alanina (+1.8), glicina (-0.4), treonina (-0.7), serina (-0.8), triptófano (-0.9), tirosina (-1.3), prolina (-1.6), histidina (-3.2), glutamato (-3.5), glutamina (-3.5), aspartato (-3.5), asparagina (-3.5), lisina (-3.9) y arginina (-4.5).

En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de aminoácidos al conferir la función biológica interactiva sobre una proteína (véase, por ejemplo, Kyte et ál., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Es de conocimiento en la técnica que determinados aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos con una calificación o un índice hidropático similar y aun conservar una actividad biológica similar. Al realizar cambios según el índice hidropático, en varias modalidades, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En varias modalidades, se incluyen aquellos que están dentro de ± 1 y, en varias modalidades, se incluyen aquellos que están dentro de ± 0.5 .

También se comprende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente según la hidrofiliidad, particularmente cuando el péptido o la proteína biológicamente funcional creados de esa forma se pretenden para el uso en modalidades inmunológicas, como se describe en la presente. En varias modalidades, la mejor hidrofiliidad promedio local de una proteína, como se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se asignaron los siguientes valores de hidrofiliidad a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0+-.1); glutamato (+3.0+-.1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5+-.1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5) y triptófano (-3.4). Al realizar cambios según los valores de hidrofiliidad similares, en varias modalidades, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad se encuentran dentro de ± 2 , en varias modalidades, se incluyen aquellos que se encuentran dentro de ± 1 y, en varias modalidades, se incluyen aquellos que se encuentran dentro de ± 0.5 .

Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas se establecen en la Tabla 1.

Tabla 1

<u>Residuos originales</u>	<u>Sustituciones ilustrativas</u>	<u>Sustituciones preferidas</u>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	
Asp	Glu	

	Cys	Ser, Ala	Ser
	Gln	Asn	Asn
	Glu	Asp	Asp
	Gly	Pro, Ala	Ala
5	His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
	Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
	Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
10	Lys	Arg, 1,4 Diamino-butírico Acid, Gln, Asn	Arg
	Met	Leu, Phe, Ile	Leu
	Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
	Pro	Ala	Gly
15	Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
	Thr	Ser	
	Trp	Tyr, Phe	Tyr
	Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
	Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu
20			

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas de polipéptidos tal como se establecen en la presente mediante el uso de técnicas conocidas. En varias modalidades, un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden ser modificadas sin destruir la actividad al dirigirse a regiones que no se creen importantes para la actividad. En otras modalidades, el experto en la técnica puede identificar residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En modalidades adicionales, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura, pueden someterse a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar negativamente la estructura del polipéptido.

De manera adicional, un experto en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de dicha comparación, el experto en la técnica puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en un polipéptido que corresponde a los residuos de aminoácidos importantes para la actividad o la estructura en polipéptidos similares. Un experto en la técnica puede elegir sustituciones de aminoácidos químicamente similares para estos residuos de aminoácidos que se

predicen importantes.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos con relación a esa estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un experto en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácidos de un polipéptido con respecto a su estructura tridimensional. En varias modalidades, un experto en la técnica puede elegir no realizarle cambios radicales a los residuos de aminoácidos que se predice que van a estar en la superficie del polipéptido, dado que dichos residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácidos en cada residuo de aminoácidos deseado. Las variantes se pueden analizar luego con el uso de ensayos de actividad conocidos para el experto en la técnica. Dichas variantes se podrían utilizar para recopilar información sobre las variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubriera que un cambio a un residuo de aminoácidos particular produciría que la actividad se destruya, se reduzca de manera no deseable o sea inadecuada, las variantes con dicho cambio pueden evitarse. En otras palabras, según la información recopilada en dichos experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos donde se deberían evitar sustituciones adicionales ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

La expresión «fragmento polipeptídico» y «polipéptido trunco», como se usa en la presente, hacen referencia a un polipéptido que tiene una eliminación en el extremo amino y/o en el extremo carboxi en comparación con una proteína de longitud completa correspondiente. En determinadas modalidades, los fragmentos pueden tener una longitud, por ejemplo, de al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900 o al menos 1000 aminoácidos. En determinadas modalidades, los fragmentos también pueden tener una longitud, por ejemplo, como máximo 1000, como máximo 900, como máximo 800, como máximo 700, como máximo 600, como máximo 500, como máximo 450, como máximo 400, como máximo 350, como máximo 300, como máximo 250, como máximo 200, como máximo 150, como máximo 100, como máximo 50, como máximo 25, como máximo 10 o como máximo 5 aminoácidos. Un fragmento puede comprender adicionalmente, en un extremo o ambos extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína de origen natural diferente (por ejemplo, un dominio Fc o de cremallera de leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia de enlace artificial).

Las expresiones «variante de polipéptido», «polipéptido híbrido» y «mutante de polipéptido», tal como se usan en la presente, hacen referencia a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos se insertan, eliminan y/o sustituyen en

la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptidos. En determinadas modalidades, la cantidad de residuos de aminoácidos a insertar, eliminar o sustituir puede ser una longitud, por ejemplo, de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450 o al menos 500 aminoácidos. Los híbridos de la presente descripción incluyen proteínas de fusión.

Un «derivado» de un polipéptido es un polipéptido que se modificó en forma química, por ejemplo, conjugación a otro resto químico tal como, por ejemplo, polietilenglicol, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano), fosforilación y glicosilación.

La expresión «% de identidad de secuencia» se usa indistintamente en la presente con la expresión «% de identidad» y hace referencia al nivel de identidad de la secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias peptídicas o el nivel de identidad de secuencia de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean con el uso de un programa de alineación de secuencias. Por ejemplo, tal como se usa en la presente, 80 % de identidad significa lo mismo que 80 % de identidad de secuencia determinado por un algoritmo definido y significa que una secuencia determinada es al menos 80 % idéntica a otra longitud de otra secuencia. En determinadas modalidades, el % de identidad se selecciona, por ejemplo, de, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % o más identidad de secuencia respecto a una secuencia determinada. En determinadas modalidades, el % de identidad se encuentra en el intervalo, por ejemplo, de alrededor de 60 % a alrededor de 70 %, alrededor de 70 % a alrededor de 80 %, alrededor de 80 % a alrededor de 85 %, alrededor de 85 % a alrededor de 90 %, alrededor de 90 % a alrededor de 95 % o alrededor de 95 % a alrededor de 99 %.

La expresión «% de identidad de homología» se usa indistintamente en la presente con la expresión «% de homología» y hace referencia al nivel de homología de la secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias peptídicas o el nivel de homología de secuencia de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean con el uso de un programa de alineación de secuencias. Por ejemplo, tal como se usa en la presente, 80 % de homología significa lo mismo que 80 % de homología de secuencia determinada por un algoritmo definido, y por consiguiente un homólogo de una secuencia determinada tiene más de 80 % de homología de secuencia respecto a una longitud de la secuencia determinada. En determinadas modalidades, el % de homología se selecciona, por ejemplo, de, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % o más homología de secuencia respecto a una secuencia determinada. En determinadas modalidades, el % de

homología se encuentra en el intervalo, por ejemplo, de alrededor de 60 % a alrededor de 70 %, alrededor de 70 % a alrededor de 80 %, alrededor de 80 % a alrededor de 85 %, alrededor de 85 % a alrededor de 90 %, alrededor de 90 % a alrededor de 95 % o alrededor de 95 % a alrededor de 99 %.

- 5 Los programas informáticos ilustrativos que se pueden usar para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, de modo no taxativo, el paquete de programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, disponibles al público en Internet en el sitio web de NCBI. Véase también Altschul et ál., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990 (con especial referencia a la configuración predeterminada publicada, es decir, los parámetros $w=4$, $t=17$) y Altschul et ál., Nucleic
10 Acids Res., 25:3389-3402, 1997. Las búsquedas de secuencias normalmente se llevan a cabo con el uso del programa BLASTP cuando se evalúa una secuencia de aminoácidos determinada respecto a las secuencias de aminoácidos en las Secuencias de proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para buscar secuencias de ácido nucleico que se tradujeron en todos los marcos de lectura en oposición a las secuencias de aminoácidos en
15 las Secuencias de proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTP como BLASTX se ejecutan con el uso de parámetros predeterminados de una penalización por hueco abierto de 11.0 y una penalización por extensión de hueco de 1.0 y utilizan la matriz BLOSUM-62. Véase Id.

- Además del cálculo del porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza
20 un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de
25 referencia si la menor probabilidad de suma en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es, por ejemplo, menor que alrededor de 0.1 o menor que alrededor de 0.01 o menor que alrededor de 0.001.

- El término «heterólogo», tal como se usa en la presente hace referencia a una composición o estado que no es natural o no se encuentra en la naturaleza, por ejemplo, que se puede lograr mediante el
30 remplazo de una composición o estado natural existente con uno que deriva de otra fuente. De manera similar, la expresión de una proteína en un organismo que no sea el organismo en el cual se expresa naturalmente esa proteína constituye un sistema de expresión heteróloga y una proteína heteróloga.

- El término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, hace referencia a una proteína que
35 comprende uno o más polipéptidos considerablemente o parcialmente codificados por genes de

inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina que tiene especificidad respecto a un antígeno tumoral o especificidad respecto a una molécula sobreexpresada en un estado patológico. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como también subtipos de estos genes e innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras (LC, por sus siglas en inglés) se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas (HC, por sus siglas en inglés) se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural típica de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par con una cadena «ligera» (alrededor de 25 kD) y una cadena «pesada» (alrededor de 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno.

La expresión «región Fc» tal como se usa en la presente define la región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se puede generar por digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La «región Fc» puede ser una secuencia natural de región Fc o una región Fc variante. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y opcionalmente comprende un dominio C_{H4} . La parte de Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citocina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y la tasa de semivida/depuración del anticuerpo y complejos de antígeno-anticuerpo (por ejemplo, el FcR neonatal (FcRn) se une a la región Fc de IgG a pH ácido en el endosoma y protege la IgG de la degradación, lo que contribuye de este modo a la semivida en suero prolongada de IgG). En la técnica se conocen reemplazos de residuos de aminoácidos en la parte Fc para alterar la función efectora del anticuerpo (véase, por ejemplo, Winter et ál., patente estadounidense n.º 5,648,260 y 5,624,821).

«Polinucleótido» hace referencia a un polímero compuesto de unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, tales como ácido desoxirribonucleico («ADN») y ácido ribonucleico («ARN») así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácido nucleico incluyen aquellos que incluyen bases de origen no natural, nucleótidos que se acoplan en enlaces con otros nucleótidos que no sean el enlace fosfodiéster de origen natural o que incluyan bases unidas mediante enlaces que no sean enlaces de fosfodiéster. Por tanto, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y de modo no taxativo, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosfortriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptidonucleicos (PNA, por sus siglas en inglés) y similares. Tales

polinucleótidos se pueden sintetizar, por ejemplo, con el uso de un sintetizador de ADN automático. La expresión «ácido nucleico» normalmente hace referencia a polinucleótidos grandes. El término «oligonucleótidos» normalmente hace referencia a polinucleótidos cortos, en general que no superan alrededor de 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando se representa una secuencia de nucleótidos con una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la cual «U» reemplaza la «T».

Se usa en la presente la notación convencional para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótidos de cadena simple es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de una secuencia de polinucleótidos de cadena doble se denomina la dirección 5'. La adición de nucleótidos en la dirección de 5' a 3' a transcripciones de ARN incipientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el ARNm se denomina «cadena de codificación»; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito de ese ADN y que se ubican en 5' respecto al extremo 5' de la transcripción de ARN se denominan «secuencias anteriores»; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que se ubican en 3' respecto al extremo 3' de la transcripción del ARN codificante se denominan «secuencias posteriores».

«Complementario/a» hace referencia a la compatibilidad topológica o coincidencia de las superficies que interactúan de dos polinucleótidos. Por lo tanto, las dos moléculas se pueden describir como complementarias, y además las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí. Un primer polinucleótido es complementario respecto a un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es considerablemente idéntica a la secuencia de nucleótidos del compañero de unión de polinucleótido del segundo polinucleótido, o si el primer polinucleótido puede hibridarse al segundo polinucleótido en condiciones de hibridación rigurosas.

«Que se hibrida específicamente a» o «hibridación específica» o «que se hibrida en forma selectiva a» hacen referencia a la unión, duplicación o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia se encuentra presente en un ADN o ARN de mezcla compleja (por ejemplo, celular total). La expresión «condiciones rigurosas» hace referencia a condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente a su subsecuencia diana y, en menor proporción o ninguna, a otras secuencias. «Hibridación rigurosa» y «condiciones de lavado de hibridación rigurosas», en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico tales como hibridaciones Southern y Northern, dependen de la secuencia y son diferentes según los diferentes parámetros del entorno. Se puede encontrar una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid

probe assays», Elsevier, N.Y.; Sambrook et ál., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3.sup.rd ed., NY; y Ausubel et ál., eds., edición actual, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

En general, las condiciones de lavado e hibridación muy rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 °C menos que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La T_m es la temperatura (con una fuerza iónica y pH definidos) a la cual se hibrida el 50 % de la secuencia diana a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean equivalentes al T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones rigurosas de hibridación para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de alrededor de 100 residuos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o Northern es de formalina al 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C. La hibridación se lleva a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy rigurosas es NaCl 0.15 M a 72 °C durante alrededor de 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado 0.2 x SSC a 65 °C durante 15 minutos. Véase Sambrook et ál. para la descripción del amortiguador SSC. Un lavado de rigurosidad elevada puede ser precedido por un lavado de rigurosidad baja para eliminar una señal de sonda de fondo. Un lavado de rigurosidad media ilustrativo para un dúplex de, por ejemplo, más de alrededor de 100 nucleótidos, es 1 x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Un lavado de rigurosidad baja ilustrativo para un dúplex de, por ejemplo, más de alrededor de 100 nucleótidos, es 4-6 x SSC a 40°C durante 15 minutos. En general, una relación de señal respecto a ruido de 2 x (o más) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

«Cebador» hace referencia a un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a una plantilla de polinucleótido designada y proporcionar un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tal síntesis ocurre cuando el cebador de polinucleótido se ubica en condiciones en las cuales se induce la síntesis, es decir en presencia de nucleótidos, una plantilla de polinucleótido complementaria y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa. Un cebador normalmente es de cadena simple pero puede ser de cadena doble. Los cebadores son normalmente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia gama de cebadores sintéticos y de origen natural son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario a la plantilla para la cual se diseñó para hibridarse para que sirva como sitio de inicio de la síntesis, pero no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica del cebador depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores se pueden marcar, por ejemplo, con restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

«Sonda», cuando se usa con referencia a un polinucleótido, hace referencia a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente a una secuencia designada de otro polinucleótido. Una sonda se

hibrida específicamente a un polinucleótido complementario diana pero no tiene por qué reflejar la secuencia complementaria exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica de la sonda a la diana depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas se pueden marcar, por ejemplo, con restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

- 5 En casos en los que una sonda proporciona un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario, una sonda puede ser también un cebador.

Un «vector» es un polinucleótido que puede usarse para introducir otro ácido nucleico enlazado a este en una célula. Un tipo de vector es un «plásmido», que hace referencia a una molécula de ADN de cadena doble lineal o circular en la cual se pueden ligar segmentos adicionales de ácido nucleico.

- 10 Otro tipo de vector es un vector viral (por ejemplo, retrovirus con deficiencia de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), en donde los segmentos de ADN adicionales pueden introducirse en el genoma viral. Ciertos vectores pueden tener replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, los vectores bacteriales que contienen un origen bacterial de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores
15 no episomales de mamíferos) están integrados en el genoma de una célula hospedadora luego de la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Un «vector de expresión» es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

- Una «secuencia reguladora» es un ácido nucleico que afecta la expresión (por ejemplo el nivel, el
20 tiempo o la ubicación de la expresión) de un ácido nucleico al cual está ligado operativamente. La secuencia reguladora puede, por ejemplo, ejercer sus efectos directamente en el ácido nucleico regulado o mediante la acción de una o más de otras moléculas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/ al ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales
25 de poliadenilación). Se describen ejemplos adicionales de secuencias reguladoras, por ejemplo, en Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. y Baron et ál., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06. Una secuencia de nucleótidos está «ligada operativamente» a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora afecta la expresión (por ejemplo, el nivel, el tiempo o la ubicación de la expresión) de la secuencia de nucleótidos.

- 30 Una «célula hospedadora» es una célula que se puede usar para expresar un polinucleótido de la descripción. Una célula hospedadora puede ser una procariota, por ejemplo *E. coli*, o una eucariota, por ejemplo, una eucariota unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula vegetal (por ejemplo, una célula de planta de tabaco o de tomate), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, de mono, de hámster, de rata, de ratón o de insecto) o un hibridoma. Comúnmente, una
35 célula hospedadora es una célula cultivada que puede ser transformada o transfectada con un ácido

nucleico que codifica polipéptidos, que puede expresarse luego en una célula hospedadora. La frase «célula hospedadora recombinante» puede ser utilizada para denotar una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con un ácido nucleico que se va a expresar. Una célula hospedadora puede también ser una célula que comprende el ácido nucleico pero que no lo expresa en un nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia reguladora en la célula hospedadora de manera que se una de manera operativa con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula hospedadora se refiere no solo a la célula en cuestión en particular, sino también a la progenie o posible progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido, por ejemplo, a una mutación o influencia ambiental, dicha progenie puede no ser de hecho idéntica a la célula original, pero igual se incluye dentro del alcance del término tal como se usa en la presente.

La expresión «molécula aislada» (cuando la molécula es, por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido) es una molécula que, en virtud de su origen o fuente de derivación, (1) no se asocia con los componentes que se asocia naturalmente que la acompañan en su estado natural, (2) carece considerablemente de otras moléculas de su misma especie, (3) se expresa en una célula de una especie diferente o (4) no es de origen natural. Por lo tanto, una molécula que se sintetiza de forma química o se expresa en un sistema celular diferente del de la célula a partir de la cual se origina naturalmente estará «aislada» de los componentes que naturalmente se asocian a ella. También se puede hacer que una molécula carezca considerablemente de los componentes que naturalmente se asocian a ella mediante el aislamiento, utilizando técnicas de purificación que se conocen en la técnica. Puede evaluarse la pureza u homogeneidad de las moléculas mediante una cantidad de maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptido puede someterse a ensayo usando electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido por medio de procedimientos conocidos en la técnica. Para determinados fines, se puede proporcionar una resolución más alta utilizando HPLC u otros medios conocidos en la técnica para la purificación.

Una proteína o polipéptido es «considerablemente puro», «considerablemente homogéneo» o está «considerablemente purificado» cuando al menos alrededor de 60 % a 75 % de una muestra presenta una única especie de polipéptidos. El polipéptido o proteína puede ser monomérica o multimérica. Un polipéptido o proteína considerablemente pura normalmente comprenderá alrededor de 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % P/P de una muestra de proteína, más comúnmente alrededor de 95 % y preferentemente será más de 99 % pura. La pureza u homogeneidad de proteínas se puede indicar mediante una cantidad e medios conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de la visualización de una banda de polipéptido individual tras la tinción del gel con un tinte conocido en la técnica. Para

determinados fines, se puede proporcionar una resolución más alta utilizando HPLC u otros medios conocidos en la técnica para la purificación.

«Enlazador» hace referencia a una molécula que se une a otras dos moléculas, ya sea en forma covalente o mediante enlaces iónicos, de van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se hibrida a una secuencia complementaria en el extremo 5' y a otra secuencia complementaria en el extremo 3', lo que une por tanto dos secuencias no complementarias. Un «enlazador escindible» hace referencia a un enlazador que puede degradarse o cortarse de otro modo para separar los dos componentes conectados mediante el enlazador escindible. Generalmente los enlazadores escindibles se escinden mediante enzimas, normalmente peptidasas, proteasas, nucleasas, lipasas y similares. Los enlazadores escindibles se pueden escindir también mediante eventos ambientales, tales como, por ejemplo, cambios en la temperatura, el pH, la concentración de sal, etc.

Los términos «etiqueta» o «marcado» como se usan en la presente hacen referencia a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una modalidad, la etiqueta es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotínulo que se pueden detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o calorimétricos). En otra modalidad, la etiqueta o marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un conjugado de fármaco o toxina. En la técnica se conocen y se pueden utilizar diversos métodos para etiquetar polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, de modo no taxativo, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínulo, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informante secundario (por ejemplo, secuencias del par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como toxina de tos ferina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de estos. En algunas modalidades, las etiquetas se unen mediante brazos separadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

«Composición farmacéutica» hace referencia a una composición adecuada para su uso farmacéutico en un animal. Una composición farmacéutica comprende una cantidad

farmacológicamente eficaz de un agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. «Cantidad farmacológicamente eficaz» hace referencia a aquella cantidad de un agente eficaz para producir el resultado farmacológico pretendido. «Portador farmacéuticamente aceptable» hace referencia a cualquier portador, vehículo, amortiguador y excipiente farmacéutico estándar, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, solución acuosa de dextrosa al 5 % y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y varios tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Los portadores y formulaciones farmacéuticas adecuadas se describen en en Remington's Pharmaceutical Sciences, 21° Ed. 2005, Mack Publishing Co, Easton. Una «sal farmacéuticamente aceptable» es una sal que puede formularse en un compuesto para su uso farmacéutico, inclusive, por ejemplo, sales metálicas (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

Los términos «tratar», «tratando» y «tratamiento» hacen referencia a un método para aliviar o anular un trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas concomitantes. Tal como se usa en la presente, «aliviar» una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en la presente a «tratamiento» incluyen referencias al tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

Se entiende que aspectos y modalidades de la descripción descritos en la presente incluyen «que consiste en» y/o «que consiste esencialmente en» aspectos y modalidades.

La referencia a «alrededor de» un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) variaciones dirigidas a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a «alrededor de X» incluye la descripción de «X».

Tal como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular «un», «una», «o», «el» y «la» incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entiende que los aspectos y las variaciones de la descripción descrita en la presente incluyen «que consiste en» y/o «que consiste esencialmente en» aspectos y variaciones.

Indicaciones clínicas-Usos terapéuticos

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de trastornos relacionados con la miostatina o la activina en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. Cabe destacar que las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden usar para aumentar la masa muscular magra como porcentaje del peso corporal y disminuir la masa de grasa como porcentaje de peso corporal, mientras que se evitan preocupaciones en cuanto a seguridad informadas para los terapéuticos ya existentes basados en proteínas de fusión ActRIIB-Fc.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde tal administración atenúa la pérdida de masa muscular y/o la pérdida de función muscular. En varias modalidades, la atrofia muscular se asocia con una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en: distrofias musculares (tales como DMD, DM de Becker, DM de Limb-Girdle, DM miotónica y FSHD), miositis (tal como dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión), miopatía (inclusive miopatía heredada así como miopatía adquirida tal como miopatía inducida por terapia de privación de andrógenos, corticosteroides o estatinas), enfermedad de la motoneurona (tal como enfermedad de Lou Gehrig o ALS), atrofia muscular espinal (inclusive atrofia muscular espinal progresiva infantil, atrofia muscular espinal intermedia, atrofia muscular espinal juvenil y atrofia muscular espinal en adultos), enfermedad de la unión neuromuscular (tal como miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton y botulismo), enfermedad del nervio periférico (tal como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Dejerine-Sottas y ataxia de Friedreich), lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas (inclusive enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), cáncer (tal como cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de cuello y cabeza, cáncer de ovario, rabdomiosarcoma, glioma, neuroblastoma, linfoma y mieloma múltiple, cáncer de piel y cáncer sanguíneo), insuficiencia orgánica (tal como insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal e insuficiencia hepática, traumatismos (tales como quemaduras o accidentes en motocicletas), desuso (tal como reposo prolongado, hospitalización y vuelos espaciales), infección (tal como VIH, polio y sepsis), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y envejecimiento (tal como sarcopenia, obesidad sarcopénica y osteoartritis).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad ósea en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad ósea se selecciona del grupo que consiste en: osteoporosis, osteodistrofia renal, osteogénesis imperfecta, fibrodisplasia osificante progresiva, pérdida ósea inducida por corticosteroides, pérdida ósea inducida por terapia de privación de andrógenos, fractura de cadera, pérdida ósea inducida por cáncer, metástasis ósea, enfermedad de Paget, Rickets, osteomalacia, enfermedad de Perthes y displasia fibrosa.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno metabólico en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en: síndrome metabólico, obesidad, dislipidemia, obesidad sarcopénica, enfermedad de hígado graso no alcohólica tal como esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), enfermedad de hígado graso alcohólica, resistencia a la insulina, diabetes así como miopatía diabética, nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética y hemocromatosis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la fibrosis en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, fibrosis hepática, cirrosis, atresia biliar, infarto de miocardio, fibrosis cardíaca, fibrosis renal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, dermopatía fibrosante nefrogénica, enfermedad intestinal inflamatoria o enfermedad de Crohn, queloide, escleroderma, fibrosis retroperitoneal y artrofibrosis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune/inflamatoria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: trastornos autoinmunes/inflamatorios, inclusive esclerosis múltiple (EM), esclerosis sistémica, diabetes (tipo 1), glomerulonefritis, miastenia gravis, psoriasis, lupus sistémico eritematoso, polimiositis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y cirrosis biliar primaria, artritis, asma y sepsis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en: insuficiencia cardíaca, atrofia cardíaca, hipertensión arterial pulmonar (PAH, por sus siglas en inglés), miocarditis, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, arritmias

cardíacas, valvulopatía cardíaca, cardiomiopatía, enfermedad pericárdica, enfermedad de la aorta, síndrome de Marfan y trasplante cardíaco.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una disfunción cardíaca o insuficiencia cardíaca en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB en el sujeto. La modulación puede mejorar la función cardíaca del sujeto al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %. La mejora de la función cardíaca puede evaluarse mediante ecocardiografía para medir 1) las funciones de bombeo cardíacas enfocándose en el volumen de sangre expulsado y la eficiencia de expulsión y 2) las funciones de miocardio enfocándose en la fuerza de la contracción del miocardio.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de células cancerosas en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable, en donde tal administración inhibe el crecimiento y/o la proliferación de una célula cancerosa. Específicamente, una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción es útil en el tratamiento de trastornos caracterizados como cáncer. Tales trastornos incluyen, de modo no taxativo, tumores sólidos, tales como cánceres de mama, de las vías respiratorias, de cerebro, de los órganos reproductores, tracto digestivo, tracto urinario, ojo, hígado, piel, cabeza y cuello, tiroides, paratiroides y sus metástasis distantes, linfomas, sarcomas, mieloma múltiple y leucemia. Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, de modo no taxativo, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal in situ y carcinoma lobular in situ. Los ejemplos de cánceres de las vías respiratorias incluyen, de modo no taxativo, carcinoma de pulmón de células microcíticas y no microcíticas, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar. Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, de modo no taxativo, glioma hipofálmico y tronco encefálico, astrocitoma cerebelar y cerebral, meduloblastoma, ependimoma, así como tumor neuroectodérmico y pineal. Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, de modo no taxativo, cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, de modo no taxativo, cáncer de endometrio, cuello uterino, ovario, vagina y vulva, así como sarcoma del útero. Los tumores del tracto digestivo incluyen, de modo no taxativo, cánceres de ano, colon, colorrectal, esófago, vesícula, gástrico, pancreático, rectal, de intestino delgado y de las glándulas salivales. Los tumores del tracto urinario incluyen, de modo no taxativo, cánceres de vejiga, pene, riñón, pelvis renal, uréter y uretrales. Los cánceres oculares incluyen, de modo no taxativo, melanoma intraocular

y retinoblastoma. Los ejemplos de cánceres hepáticos incluyen, de modo no taxativo carcinoma hepatocelular (carcinomas de células hepáticas con o sin una variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma del ducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto. Los cánceres de piel incluyen, de modo no taxativo, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel distinto de melanoma. Los cánceres de cuello y cabeza incluyen, de modo no taxativo, cáncer nasofaríngeo y cáncer de labio y de la cavidad oral. Los linfomas incluyen, de modo no taxativo, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos T cutáneos, enfermedad de Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central. Los sarcomas incluyen, de modo no taxativo, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rabdomiosarcoma. Las leucemias incluyen, de modo no taxativo, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas. En determinadas modalidades, el cáncer será un cáncer con una expresión elevada del miembro de la familia de TGF- β , tal como activina A, miostatina, TGF- β y GDF15, por ejemplo, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, melanoma, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer cerebral, cáncer de vejiga y cáncer de cuello y cabeza. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad renal crónica (CKD) en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable, en donde tal administración atenúa la pérdida de la masa muscular y/o la pérdida de la función muscular o inhibe la fibrosis renal. Específicamente, una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción es útil en el tratamiento de CKD, inclusive insuficiencia renal, fibrosis intersticial y diálisis renal así como desgaste proteico energético (PEW) asociado con CKD. La modulación puede mejorar la CKD o el PEW del sujeto al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %. La mejora de la función renal se puede evaluar mediante la medición de la relación de proteína/creatinina (PCR, por sus siglas en inglés) en la orina y la velocidad de filtración glomerular (GFR, por sus siglas en inglés). La mejora del PEW se puede evaluar mediante la medición de los niveles en suero de albúmina y las citocinas inflamatorias, la velocidad de síntesis y degradación proteica, la masa corporal, la masa muscular, los resultados de la actividad física y la nutrición. En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de la artritis en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea

como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. Específicamente, una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción es útil en el tratamiento de una artritis que se selecciona de artritis reumatoide y osteoartritis.

- 5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de la anorexia en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. Específicamente, una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción es útil en el tratamiento de una
- 10 anorexia que se selecciona de anorexia nerviosa y síndrome de anorexia-caquexia.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad hepática en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable.

- 15 Específicamente, una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción es útil en el tratamiento de una enfermedad hepática que se selecciona de enfermedad de hígado graso no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de hígado graso alcohólica, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, hepatitis autoinmune y carcinoma hepatocelular.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el trasplante de órganos o tejidos

- 20 en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. Específicamente, una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción es útil en el tratamiento de un trasplante que se selecciona de trasplante de órganos de corazón, riñones, hígado, pulmones,
- 25 páncreas, intestino y timo o de trasplantes tisulares de huesos, tendones, córneas, piel, válvulas cardíacas, nervios y venas.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de la anemia en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando

- 30 ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la anemia se selecciona de diversos trastornos anémicos, inclusive anemia asociada a cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia asociada a la enfermedad renal crónica, anemia por carencia de hierro, talasemia, anemia drepanocítica, anemia aplásica y síndromes mielodisplásicos.

- 35 En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento del dolor en un

sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas de la invención a un sujeto que lo necesite. En una modalidad, el sujeto es un sujeto humano. En varias modalidades, el dolor se selecciona de dolor neuropático, dolor inflamatorio o dolor por cáncer.

- 5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del envejecimiento en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la afección del envejecimiento se selecciona del grupo que
- 10 consiste en: fragilidad del adulto mayor, sarcopenia relacionada con la edad y osteoartritis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para inducir el crecimiento de células madre para la reparación de tejidos o regeneración de órganos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en una pauta de tratamiento combinada) de una trap híbrida del ligando de ActRIIB de la presente

15 descripción en un portador farmacéuticamente aceptable. En varias modalidades, la célula madre se selecciona del grupo que consiste en: célula madre muscular (satélite), célula madre cardíaca, célula madre mesenquimal derivada de médula ósea y célula madre pluripotente.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para inhibir la pérdida de masa muscular y/o la función muscular en un sujeto, que comprende la administración de una

20 cantidad eficaz de la trap híbrida del ligando ActRIIB al sujeto. La modulación puede atenuar la pérdida de masa muscular y/o la función del sujeto al menos 5 %, 10 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 %. La inhibición de la pérdida de masa muscular y la función muscular puede evaluarse mediante el uso de técnicas de imagenología y pruebas de resistencia física. Los ejemplos de técnicas de imagenología para la evaluación de la masa muscular incluyen

25 absorciometría de rayos X con doble energía (DEXA, por sus siglas en inglés), imágenes por resonancia magnética (IRM) y tomografía computada (TC). Los ejemplos de pruebas de la función muscular incluyen la prueba de fuerza de agarre, la prueba de subir escaleras, batería breve de desempeño físico (SPPB, por sus siglas en inglés) y una caminata de 6 minutos, así como la presión inspiratoria máxima (MIP, por sus siglas en inglés) y presión expiratoria máxima (MEP, por sus siglas

30 en inglés) que se usan para medir la fuerza muscular respiratoria.

«Cantidad terapéuticamente eficaz» o «dosis terapéuticamente eficaz» hace referencia a aquella cantidad del agente terapéutico que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas del trastorno que se esté tratando.

Se puede calcular una dosis terapéuticamente eficaz de forma inicial a partir de ensayos de cultivo

35 celular mediante la determinación del IC_{50} . Entonces, es posible formular una dosis en modelos

animales para lograr un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluye la IC_{50} tal como se determina en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles para los seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante HPLC. El médico particular puede elegir la composición, vía de administración y dosificación exactas en vista de la condición del sujeto.

Las pautas de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas (múltiples o repetidas o de mantenimiento) en el transcurso del tiempo y la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. Las formas de dosificación unitaria tal como se utilizan en la presente hacen referencia a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la presente descripción estarán dictadas principalmente por las características únicas del anticuerpo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desee lograr.

Por lo tanto, el experto en la técnica apreciará, según la descripción que se proporciona en la presente, que la dosis y la pauta de dosificación se ajusta de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica terapéutica. Es decir, la dosis tolerable máxima puede establecerse fácilmente, y la cantidad eficaz que proporciona un beneficio terapéutico detectable a un sujeto también se puede determinar, así como también los requisitos temporales para la administración de cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable al sujeto. Por consiguiente, si bien determinadas dosis y pautas de administración se ejemplifican en la presente, estos ejemplos no limitan de forma alguna la dosis y la pauta de administración que se puede proporcionar a un sujeto en la práctica de la presente descripción.

Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar y puede incluir dosis individuales o múltiples. Se debe entender además que para cualquier sujeto en particular se deben ajustar las pautas de dosificación específicas en el transcurso del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación que se establecen en la presente son únicamente a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance o la puesta en práctica de la composición reivindicada. Además, la pauta de dosificación con las composiciones de la presente descripción puede basarse en una diversidad de factores,

inclusive el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, la afección médica del sujeto, la gravedad de la afección, la vía de administración y el anticuerpo particular empleado. Por ende, la pauta de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse de forma rutinaria utilizando métodos estándar. Por ejemplo, las dosis se pueden ajustar según los parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente descripción abarca un aumento de dosis entre sujetos tal como lo determina un experto en la técnica. La determinación de las dosificaciones apropiadas y las pautas se conocen en la técnica relevante y se entendería que serán comprendidas por los expertos en la técnica una vez que se le proporcionen las indicaciones que se describen en la presente.

Un intervalo ilustrativo de dosificación diaria no taxativo para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la descripción puede ser 0.001 a 100 mg/kg, 0.001 a 90 mg/kg, 0.001 a 80 mg/kg, 0.001 a 70 mg/kg, 0.001 a 60 mg/kg, 0.001 a 50 mg/kg, 0.001 a 40 mg/kg, 0.001 a 30 mg/kg, 0.001 a 20 mg/kg, 0.001 a 10 mg/kg, 0.001 a 5 mg/kg, 0.001 a 4 mg/kg, 0.001 a 3 mg/kg, 0.001 a 2 mg/kg, 0.001 a 1 mg/kg, 0.010 a 50 mg/kg, 0.010 a 40 mg/kg, 0.010 a 30 mg/kg, 0.010 a 20 mg/kg, 0.010 a 10 mg/kg, 0.010 a 5 mg/kg, 0.010 a 4 mg/kg, 0.010 a 3 mg/kg, 0.010 a 2 mg/kg, 0.010 a 1 mg/kg, 0.1 a 50 mg/kg, 0.1 a 40 mg/kg, 0.1 a 30 mg/kg, 0.1 a 20 mg/kg, 0.1 a 10 mg/kg, 0.1 a 5 mg/kg, 0.1 a 4 mg/kg, 0.1 a 3 mg/kg, 0.1 a 2 mg/kg, 0.1 a 1 mg/kg, 1 a 50 mg/kg, 1 a 40 mg/kg, 1 a 30 mg/kg, 1 a 20 mg/kg, 1 a 10 mg/kg, 1 a 5 mg/kg, 1 a 4 mg/kg, 1 a 3 mg/kg, 1 a 2 mg/kg o 1 a 1 mg/kg de peso corporal. Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de las afecciones a aliviar. Se debe entender además que para cualquier sujeto en particular se deben ajustar las pautas de dosificación específicas en el transcurso del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación que se establecen en la presente son únicamente a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance o la puesta en práctica de la composición reivindicada.

En varias modalidades, la dosis total administrada logrará una concentración de anticuerpo en plasma en el intervalo de, por ejemplo, alrededor de 1 a 1000 µg/ml, alrededor de 1 a 750 µg/ml, alrededor de 1 a 500 µg/ml, alrededor de 1 a 250 µg/ml, alrededor de 10 a 1000 µg/ml, alrededor de 10 a 750 µg/ml, alrededor de 10 a 500 µg/ml, alrededor de 10 a 250 µg/ml, alrededor de 20 a 1000 µg/ml, alrededor de 20 a 750 µg/ml, alrededor de 20 a 500 µg/ml, alrededor de 20 a 250 µg/ml, alrededor de 30 a 1000 µg/ml, alrededor de 30 a 750 µg/ml, alrededor de 30 a 500 µg/ml, alrededor de 30 a 250 µg/ml.

El índice terapéutico y de toxicidad de las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y

la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre la dosis eficaz terapéutica y tóxica es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Las composiciones que exhiben índices terapéuticos amplios se prefieren generalmente.

La frecuencia de dosificación de la administración de la composición farmacéutica de trap híbrida

5 del ligando ActRIIB depende de la naturaleza del tratamiento y de la enfermedad particular que se esté tratando. El sujeto puede ser tratado en intervalos regulares, tal como semanalmente o mensualmente, hasta que se logre un resultado terapéutico deseado. Las frecuencias de dosificación ilustrativas incluyen, de modo no taxativo: una vez a la semana sin descanso; una vez a la semana, en semanas alternas; una vez cada 2 semanas; una vez cada 3 semanas; 10 semanalmente sin descanso durante 2 semanas, luego mensualmente; semanalmente sin descanso durante 3 semanas, luego mensualmente; mensualmente; en meses alternos; una vez cada tres meses; una vez cada cuatro meses; una vez cada cinco meses; o una vez cada seis meses, o anualmente.

Tratamiento combinado

15 Tal como se usa en la presente, las expresiones «administración conjunta», «coadministrado» y «combinado con», con referencia a una trap híbrida del ligando ActRIIB de la descripción y uno o más de otros agentes terapéuticos, pretende significar, hace referencia e incluye lo siguiente: la administración simultánea de tal combinación de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la descripción y agentes terapéuticos a un sujeto que necesite tratamiento, cuando tales componentes 20 se formulen juntos en una única forma de dosificación que libere dichos componentes considerablemente al mismo tiempo a dicho sujeto; la administración considerablemente simultánea de tal combinación de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la descripción y agentes terapéuticos a un sujeto que necesite tratamiento, cuando tales componentes se formulen aparte en formas de dosificación separadas que se toman considerablemente al mismo tiempo por dicho sujeto, tras lo 25 cual se liberan dichos componentes considerablemente al mismo tiempo a dicho sujeto; la administración secuencial de tal combinación de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la descripción y los agentes terapéuticos a un sujeto que necesite tratamiento, cuando tales componentes se formulen aparte en formas de dosificación separadas que se toman en momentos consecutivos por dicho sujeto con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, tras 30 lo cual dichos componentes se liberan considerablemente en momentos diferentes a dicho sujeto; y la administración secuencial de tal combinación de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la descripción y agentes terapéuticos a un sujeto que necesite tratamiento, cuando tales componentes se formulen juntos en una forma de dosificación única que libera dichos componentes de una manera controlada, tras lo cual se liberan simultáneamente, consecutivamente y/o superpuestos al mismo 35 tiempo y/o en momentos diferentes a dicho sujeto, donde cada parte puede administrarse mediante

la misma vía o una diferente.

En otro aspecto, la presente descripción se relaciona con métodos para el tratamiento de enfermedades de atrofia muscular en un sujeto, que comprenden la administración de una combinación de a) una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB de la presente descripción; y b) un segundo agente. Este tratamiento combinado puede ser particularmente eficaz contra una enfermedad de atrofia muscular que sea resistente o refractaria al tratamiento con el uso del segundo agente solo. En varias modalidades, el segundo agente se selecciona de hormona del crecimiento, grelina, IGF1, insulina, prednisona, terapia con corticosteroides, terapia por privación de andrógenos, esteroides anabólicos, antagonistas a la angiotensina o receptor de angiotensina, antagonistas a las citocinas inflamatorias tales como TNF-alfa, IL-6, IL-1 y sus receptores y otros antagonistas a la miostatina, activina A u otro miembro de la familia TGF-beta y sus receptores, bisfosfonatos, inhibidores RANKL, agonistas de receptores activados por proliferador de peroxisoma, agonistas de $\beta 2$, activador de PGC-1alfa, inhibidores de proteasoma, terapéuticos contra el cáncer, agentes quimioterapéuticos, terapia celular, terapia con células madre, terapia génica, terapia con direccionamiento génico y terapia con oligonucleótidos antisentido.

En varias modalidades, el tratamiento combinado comprende la administración de una trap híbrida del ligando ActRIIB y composición del segundo agente simultáneamente, ya sea en la misma composición farmacéutica o en una composición farmacéutica aparte. En varias modalidades, se administran en forma secuencial una composición de trap híbrida del ligando ActRIIB y la composición del segundo agente, es decir, una composición de trap híbrida del ligando ActRIIB se administra antes o después de la administración de la composición del segundo agente.

En varias modalidades, las administraciones de la composición de trap híbrida del ligando ActRIIB y la composición del segundo agente son simultáneas, es decir, el período de administración de una composición de trap híbrida del ligando ActRIIB y la composición del segundo agente se superponen una con otra.

En varias modalidades, las administraciones de una composición de trap híbrida del ligando ActRIIB y la composición del segundo agente no son simultáneas. Por ejemplo, en varias modalidades, la administración de una composición de trap híbrida del ligando ActRIIB se termina antes de que se administre la composición del segundo agente. En varias modalidades, la administración de la composición del segundo agente se termina antes de que se administre una composición de trap híbrida del ligando ActRIIB.

Polipéptidos del receptor de activina

Tal como se usa en la presente, la expresión receptores de activina tipo II B (ActRIIB) hace referencia a los receptores de activina humana que tienen el número de registro NP_001097.2 (SEQ

ID NO: 45 en la presente) y variantes de estos. La expresión «ActRIIB-ECD de tipo salvaje» hace referencia al dominio extracelular de ActRIIB, los aminoácidos 1 a 134 (con la secuencia señal) o los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 45 (sin secuencia señal) (que se denomina en la presente como SEQ ID NO: 46). La expresión receptores de activina tipo II A (ActRIIA) hace referencia a los receptores de activina humana que tienen el número de registro UniProtKB/Swiss-Prot P27037.1 (SEQ ID NO: 47 en la presente) y variantes de estos. La expresión «ActRIIA-ECD de tipo salvaje» hace referencia al dominio extracelular de ActRIIA, los aminoácidos 1 a 135 (con la secuencia señal) o los aminoácidos 20 a 135 de la SEQ ID NO: 46 (sin secuencia señal) (que se denomina en la presente como SEQ ID NO: 48).

10 Polipéptidos ActRIIB híbridos solubles

Los métodos de la presente descripción utilizan polipéptidos novedosos ActRIIB-ECD híbridos solubles que derivan de ActRIIB-ECD de tipo salvaje y ActRIIA-ECD de tipo salvaje. Los polipéptidos ActRIIB híbridos solubles se modifican específicamente mediante el remplazo de uno o más aminoácidos de un ActRIIB-ECD de tipo salvaje trunco con los aminoácidos de un ActRIIA-ECD de tipo salvaje trunco en las posiciones correspondientes según la alineación de secuencia entre los dos dominios ECD de ActRII trunco al nivel del aminoácido. Uno o más remplazos de aminoácidos se seleccionan específicamente con fines de proporcionar polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles que demuestren una reducción evidente de la neutralización de BMP9 en comparación con el polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje, que mantiene totalmente la potente neutralización de miostatina y activina A.

En varias modalidades, el dominio extracelular trunco de ActRIIB utilizado para preparar los polipéptidos novedosos híbridos ActRIIB-ECD solubles tiene la secuencia de 110 aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 1:

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP
TAPT (SEQ ID NO: 1)

En varias modalidades, el dominio extracelular trunco de ActRIIA utilizado para preparar los polipéptidos novedosos híbridos ActRIIB-ECD solubles tiene la secuencia de 110 aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 2:

ETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
PKPP (SEQ ID NO: 2)

En varias modalidades, los métodos de la presente descripción utilizan proteínas trap híbridas novedosas del ligando ActRIIB aisladas que comprenden polipéptidos híbridos novedosos ActRIIB-ECD solubles que conservan las actividades de neutralización de la miostatina y activina A, pero

5 demuestran una neutralización de BMP9 reducida drásticamente. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos uno de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95,

10 G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de

15 la SEQ ID NO: 1 en donde al menos dos de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la

20 afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos tres de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90,

25 H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido, y en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto a un polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de

30 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos cuatro de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una

35 disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo

salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos cinco de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos seis de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos siete de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos ocho de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido, y en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto a un polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos nueve de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99,

V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos diez de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos quince de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos veinte de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos veinticinco de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido y en donde el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble que tiene la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde al menos treinta de los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 o T110 se sustituye con otro aminoácido, y en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto a un polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72 y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72 y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, en donde los residuos de aminoácidos F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde los residuos de aminoácidos F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71 y N72 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, en donde los residuos de aminoácidos Q64, E65, A68, T69, E70, E71 y N72 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, en donde los residuos de aminoácidos Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en donde los residuos de aminoácidos A68, T69, E70, E71, N72 y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, en donde los residuos de aminoácidos A68, T69, E70, E71 y N72 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 5 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, en donde los residuos de aminoácidos F58, A68, T69, E70, E71, N72 y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 10 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en donde los residuos de aminoácidos Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 y F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 15 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, en donde los residuos de aminoácidos A68, T69, E70, E71, N72, Q74 y F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 20 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, en donde los residuos de aminoácidos R3, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29 y L33 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, en donde los residuos de aminoácidos R3, L14, E15, S20, L22 y R24 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 25 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29 y L33 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 30 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, en donde los residuos de aminoácidos L14, E15, S20, L22 y R24 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

- 35 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, en donde los residuos de aminoácidos R3, L14, E15, S20, L22 y R24 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones

correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, en donde los residuos de aminoácidos R3, L14, E15 y S20 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, en donde los residuos de aminoácidos R3, L14 y E15 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, en donde los residuos de aminoácidos L14 y E15 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, en donde el residuo de aminoácido R3 de la SEQ ID NO: 1 se remplazó con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, en donde los residuos de aminoácidos Y36, S38 y K51 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33 y F58 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, en donde el residuo de aminoácido E70 de la SEQ ID NO: 1 se remplazó con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, en donde el residuo de aminoácido F58 de la SEQ ID NO: 1 se remplazó con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, en donde los residuos de aminoácidos F58 y E70 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, en donde los residuos de aminoácidos E28, Q29, F58 y E70 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29, en donde los residuos de aminoácidos E28, F58 y E70 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, en donde los residuos de aminoácidos E28 y E70 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, en donde el residuo de aminoácido E28 de la SEQ ID NO: 1 se remplazó con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, A68, T69, E70, E71, N72 y Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, en donde los residuos de aminoácidos Y7, Y8, L14, E15, S20, L22 y R24 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, en donde los residuos de aminoácidos Y36, S38, R40, S42, T45 y K51 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, en donde los residuos de aminoácidos Q64 y E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, en donde el residuo de aminoácido F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazó con el residuo de aminoácido en la posición correspondiente de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, en donde los residuos de aminoácidos E28 y F58 de la SEQ ID

NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, en donde los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52, en donde los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones

correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59, en donde los residuos de aminoácidos R3, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, en donde los residuos de aminoácidos Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, en donde los residuos de aminoácidos Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, en donde los residuos de aminoácidos Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65, en donde los residuos de aminoácidos Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, en donde los residuos de aminoácidos R3, E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, en donde los residuos de aminoácidos R3, E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

5 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, en donde los residuos de aminoácidos R3, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

10 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69, en donde los residuos de aminoácidos R3, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

15 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

20 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72, en donde los residuos de aminoácidos I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, K51, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones

correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, L48, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones

5 correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, T45, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

10 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, T45, L48, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, T45, L48, K51, Q64, E65 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

15 En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79, en donde los residuos de aminoácidos Q64, E65, F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80, en donde los residuos de aminoácidos R88, T90, H91, L92, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se

25 remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81, en donde los residuos de aminoácidos R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1

30 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, R88, T90, H91, L92, A95, G96, G97, P98, E99, V100,

35 Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos

de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, K51, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, L48, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, T45, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88, en donde los residuos de aminoácidos T45, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89, en donde los residuos de aminoácidos L48, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la

SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90, en donde los residuos de aminoácidos K51, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91, en donde los residuos de aminoácidos A68, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92, en donde los residuos de aminoácidos A68, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93, en donde los residuos de aminoácidos E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, en donde los residuos de aminoácidos E71, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95, en donde los residuos de aminoácidos N72, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96, en donde los residuos de aminoácidos Q74, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la

SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97, en donde los residuos de aminoácidos E28, Q29, A68, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, en donde los residuos de aminoácidos Q29, T69, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99, en donde los residuos de aminoácidos E28, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, en donde los residuos de aminoácidos E28, Q29, K51, T69, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101, en donde los residuos de aminoácidos E28, Q29, L48, K51, T69E, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, T45, L48, K51, T69, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103, en donde los residuos de aminoácidos Q29, L48, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones

correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, L33, Q70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105, en donde los residuos de aminoácidos L33, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106, en donde los residuos de aminoácidos E26, T45, L48, Q64, E65, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107, en donde los residuos de aminoácidos L33, T45, T69, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108, en donde los residuos de aminoácidos L33, L48, T69, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 109, en donde los residuos de aminoácidos L33, T45, L48, E70, R88, T90, H91, L92, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110, en donde los residuos de aminoácidos E28, L48, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones

correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111, en donde los residuos de aminoácidos E28, T45, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112, en donde los residuos de aminoácidos E28, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 113, en donde los residuos de aminoácidos L48, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114, en donde los residuos de aminoácidos E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115, en donde los residuos de aminoácidos E28, L48, T79, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116, en donde los residuos de aminoácidos R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E71, N72, Q74, F84 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

En varias modalidades, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117, en donde los residuos de aminoácidos E26, E28, Q29, L33, F56, E68 de la SEQ ID NO: 1 se remplazaron con los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

Proteínas heterólogas – dominios Fc

En otro aspecto, las trap híbridas del ligando ActRII comprenden un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble y al menos una proteína heteróloga unida al polipéptido ActRIIB-ECD ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora para formar una proteína de fusión a la que se hace referencia en la presente como trap híbrida del ligando ActRIIB. Tal como se utiliza en la presente, la expresión «proteína de fusión» hace referencia a una proteína que tiene un polipéptido heterólogo unido mediante técnicas de ADN recombinante. En varias modalidades, la proteína heteróloga se selecciona, de modo no taxativo, de una etiqueta de polihistidina, un Glu-Glu, una glutatión S transferasa (GST), una tioredoxina, una proteína A, una proteína G, una proteína fluorescente, una proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés), una albúmina de suero humano o un polipéptido Fc o dominio Fc. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana. En varias modalidades, el dominio Fc deriva de la secuencia de dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana que se establece en la SEQ ID NO: 38. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 39. En varias modalidades, el dominio Fc deriva de la secuencia de dominio constante de cadena pesada de IgG2 humana que se establece en la SEQ ID NO: 40. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 41. En varias modalidades, el dominio Fc deriva de la secuencia de dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana que se establece en la SEQ ID NO: 42. En varias modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 43.

Enlazadores

Las trap híbridas del ligando ActRIIB pueden comprender opcionalmente una secuencia «enlazadora» o «enlazadora bisagra». Los enlazadores sirven principalmente como espaciadores entre un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble y una proteína heteróloga u otro tipo de fusión o entre dos o más polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles. En varias modalidades, la proteína heteróloga se une al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble mediante un enlazador o un péptido enlazador bisagra. El enlazador y/o enlazador bisagra puede ser una secuencia artificial de entre 5, 10, 15, 20, 30, 40 o más aminoácidos que carecen relativamente de una estructura secundaria. En varias modalidades, los enlazadores comprenden aminoácidos que se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En varias modalidades, un enlazador se compone de una mayoría de aminoácidos que se encuentran sin restricciones entéricas, tal como glicina y alanina y son poliglicinas (particularmente (Gly)₅, (Gly)₈, poli(Gly-Ala) y polialaninas. En varias modalidades, el enlazador es rico en contenido G/S (por ejemplo, al menos alrededor de 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los aminoácidos en el enlazador son G o S. En varias modalidades, el enlazador tiene un motivo (GGGGS (SEQ ID NO: 44))_n, en donde n = 1-6. Tales enlazadores y

enlazadores bisagra se han descrito exhaustivamente en la técnica (véase, por ejemplo, US 8,410,043 (Sun et ál), que se incorpora a la presente mediante esta referencia con el fin de enseñar sobre tales enlazadores). En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 y un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 se usa para enlazar un Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 39) o un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) a un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la presente descripción.

Los enlazadores también pueden ser enlazadores no peptídicos. Por ejemplo, se pueden usar los enlazadores alquilo tales como $--NH--(CH_2)_s-C(O)--$, en donde $s = 2-20$. Estos enlazadores alquilo pueden estar sustituidos adicionalmente mediante cualquier grupo sin impedimento estérico como alquilo inferior (por ejemplo, C_1-C_6) acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo, etc.

Configuraciones moleculares para las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB

Se entiende que los diferentes elementos de la trap híbrida del ligando ActRIIB se pueden disponer de cualquier manera que sea coherente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, una proteína heteróloga puede colocarse en el extremo C respecto a un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble o alternativamente el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble puede colocarse en el extremo C respecto a un dominio heterólogo. El dominio del polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble y el dominio heterólogo no necesitan estar contiguos y se pueden incluir dominios adicionales o secuencias de aminoácidos en el extremo C o N en cualquier dominio o entre los dominios (es decir, incluir un enlazador descrito en la presente). Las configuraciones moleculares ilustrativas para las trap novedosas del ligando ActRIIB se ilustran en la FIG. 1.

Una configuración ilustrativa de un casete de ADN sintético que codifica una trap híbrida del ligando ActRIIB se puede describir en general por comprender los siguientes elementos: 1) una péptido señal (o secuencia líder) ubicada en el extremo N, que puede ser la péptido señal natural de ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 49) o cualquier péptido señal sustituta que pueda mediar el procesamiento y la secreción de las proteínas secretadas (por ejemplo, mediante el uso de una secuencia líder de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 50) como péptido señal sustituta, se puede lograr la secreción eficiente de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB en células CHO); 2) una secuencia de polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117) fusionada a la secuencia de péptido señal; 3) una secuencia de enlazador peptídico (por ejemplo, SEQ ID NO: 44) y una secuencia enlazadora bisagra (SEQ ID NO: 118), y 4) un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 39, 41 o 43) fusionado a la secuencia del polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble mediante el enlazador bisagra/peptídico.

Los ejemplos de varias modalidades de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2

	Polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble (SEQ ID NO)	Enlazador y Enlazador bisagra (SEQ ID NO)	Proteína heteróloga (SEQ ID NO)	Secuencia líder (SEQ ID NO)
5	SEQ ID NO: 3.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 4.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 5.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 6.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 7.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
10	SEQ ID NO: 8.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 9.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 10.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 11.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 12.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
15	SEQ ID NO: 13.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 14.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 15.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 16.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 17.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
20	SEQ ID NO: 18.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 19.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 20.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 21.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 22.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
25	SEQ ID NO: 23.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 24.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 25.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 26.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 27.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
30	SEQ ID NO: 28.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 29.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 30.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 31.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 32.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
35	SEQ ID NO: 33.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 34.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 35.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 36.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 37.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 51.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 52.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 53.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 54.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 55.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
	SEQ ID NO: 56.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50

[illegible]

SEQ ID NO: 100.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 101.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 102.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 103.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 104.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 105.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 106.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 107.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 108.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 109.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 110.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 111.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 112.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 113.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 114.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 115.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 116.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50
SEQ ID NO: 117.	SEQ ID NO: 44 y 118	SEQ ID NO: 39 o 41 o 43	SEQ ID NO: 49 o 50

Polinucleótidos

En otro aspecto, la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la presente descripción. Los ácidos nucleicos de la presente pueden ser de cadena simple o de cadena doble. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ADN amplificado por PCR y combinaciones de estos. El ADN genómico que codifica los polipéptidos ActRIIB se obtiene de bibliotecas genómicas que se encuentran disponibles para una cantidad de especies. El ADN sintético se encuentra disponible de síntesis química de superposición de fragmentos de oligonucleótidos seguido por el ensamblaje de los fragmentos para reconstituir parte o la totalidad de las regiones codificantes y secuencias flanqueantes. Se puede obtener ARN de vectores de expresión procariota que dirigen la síntesis de alto nivel del ARNm, tal como vectores que utilizan promotores T7 y ARN polimerasa. El ADNc se obtiene de bibliotecas preparadas a partir de ARNm aislado de varios tejidos que expresan ActRIIB. Las moléculas de ADN de la descripción incluyen genes de longitud completa así como polinucleótidos y fragmentos de estos. El gen de longitud completa también puede incluir secuencias que codifiquen la secuencia de señal en extremo N.

Tales ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para elaborar los polipéptidos híbridos novedosos ActRIIB-ECD solubles. En varias modalidades, los polinucleótidos codifican cualquiera de la secuencias de polipéptidos que se establecen en las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra

una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, los polinucleótidos codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a cualquiera de las secuencias de polipéptidos que se establecen en las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, los polinucleótidos codifican un polipéptido que tiene al menos 90 % de identidad con respecto a cualquiera de las secuencias de polipéptidos que se establecen en las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, los polinucleótidos codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 % de identidad con respecto a cualquiera de las secuencias de polipéptidos que se establecen en las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117, en donde el polipéptido ActRIIB-ECD híbrido puede unirse a miostatina y activina A, pero demuestra una baja afinidad de unión por BMP9 con respecto al polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. En varias modalidades, las secuencias de ácido nucleico de la presente descripción pueden estar aisladas, ser recombinantes y/o estar fusionadas con una secuencia de nucleótidos heterólogos o en una biblioteca de ADN.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas o moderadas con las regiones que codifican polipéptidos de los polinucleótidos descritos en la presente, en donde el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117 y en donde el polipéptido codificado puede unirse a la miostatina y activina A, pero demuestra una disminución en la afinidad de unión por BMP9 con respecto a un polipéptido ActRIIB-ECD de tipo salvaje. El experto en la técnica comprenderá fácilmente que las condiciones rigurosas adecuadas, que promueven la hibridación del ADN, pueden variarse. Por ejemplo, uno podría llevar a cabo la hibridación a 6.0 X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45 °C, seguido por un lavado de 2.0 X SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de una rigurosidad baja de alrededor de 2.0 X SSC a 50 °C a una rigurosidad alta de alrededor de 0.2 X SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentar de condiciones de rigurosidad baja a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, a condiciones de rigurosidad alta a alrededor de 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o se pueden mantener constantes la temperatura o la concentración de sal mientras que se cambia otra variable. En una modalidad, la descripción proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 X SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado a 2 X SSC a temperatura

ambiente.

En varias modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas comprenden los polinucleótidos descritos en la presente, y comprenden además un polinucleótido que codifica al menos una proteína heteróloga descrita en la presente. En varias modalidades, las moléculas de ácido nucleico comprenden además polinucleótidos que codifican los enlazadores o enlazadores bisagra descritos en la presente.

En varias modalidades, los ácidos nucleicos recombinantes de la presente descripción pueden enlazarse en forma operativa a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias reguladoras se conocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble. Por consiguiente, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Las secuencias reguladoras ilustrativas se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Normalmente, una o más de tales secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, de modo no taxativo, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de transcripción, secuencias de inicio y terminación de traducción y secuencias activadoras o potenciadoras. Los promotores constitutivos o inducibles tal como se conocen en la técnica se encuentran contemplados en la presente descripción. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En varias modalidades, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores seleccionables son ampliamente conocidos en la técnica y variarán dependiendo de la célula hospedadora utilizada.

En otro aspecto de la presente descripción, el ácido nucleico en cuestión se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble y se enlaza en forma operativa a al menos una secuencia reguladora. La expresión «vector de expresión» hace referencia a un plásmido, fago, virus o vector para la expresión de un polipéptido a partir de una secuencia de polinucleótidos. Los vectores adecuados para la expresión en células hospedadoras se encuentran disponibles con facilidad y las moléculas de ácido nucleico se insertan en los vectores con técnicas de ADN recombinante estándares. Tales vectores pueden incluir una amplia gama de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se enlazan en forma operativa a esta que se pueden usar en estos vectores para expresar las secuencias de ADN que codifican un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble. Tales secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores

precoces y tardíos de SV40, el promotor tet, el promotor precoz inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7, cuya expresión se dirige mediante el ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de ácido fosfatasa, por ejemplo, PhoS, los promotores de los factores de a-apareamiento de levadura, el promotor del poliedro del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de células procariota o eucariota o sus virus, y varias combinaciones de estos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar y/o el tipo de proteína deseada que se vaya a expresar. Además, la cantidad de copias del vector, la capacidad de controlar esa cantidad de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores antibióticos, también debe considerarse. Un vector de expresión ilustrativo, adecuado para la expresión de vActRIIB, es el pDSRa, (que se describe en WO 90/14363, que se incorpora a la presente mediante esta referencia) y sus derivados, que contiene los polinucleótidos vActRIIB, así como cualquier vector adecuado adicional conocido en la técnica o descrito más adelante.

Un ácido nucleico recombinante de la presente descripción puede producirse al ligar el gen clonado, o una parte de este, en un vector adecuado para la expresión en cualquier célula procariota, célula eucariota (levadura, ave, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido recombinante ActRIIB 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 ambas secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias y 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 pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos, adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con las secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. De manera alternativa, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (derivados de pHEBo, pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión virales (inclusive retrovirales) pueden encontrarse más adelante en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación

de los plásmidos y en la transformación de los organismos hospedadores se conocen en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como los procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2° Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contienen B-gal).

En varias modalidades, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles en cuestión 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.). Tal como resultará evidente, las construcciones génicas en cuestión pueden usarse para generar la expresión de los polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles en cuestión en células propagadas en el cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, inclusive proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

La presente descripción se refiere también a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 3-37 o 51-117) para uno o más polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles. La célula hospedadora puede ser cualquiera de una célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la presente descripción puede expresarse en células bacterianas tal como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, con el uso de un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamíferos. Otras células hospedadoras adecuadas resultarán conocidas para el experto en la técnica.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere además a métodos para la producción de los polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles en cuestión. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble puede cultivarse en condiciones adecuadas para permitir que se dé la expresión del polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble. El polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medios que contienen el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble. De manera alternativa, el polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble puede conservarse en el citoplasma o en una fracción de membrana y se pueden cultivar y lisar las células y se puede aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son conocidos en la técnica.

Los polipéptidos y proteínas de la presente descripción se pueden purificar de acuerdo con técnicas

de purificación de proteínas que resultarán conocidas para el experto en la técnica. Estas técnicas implican, en cierto nivel, el fraccionamiento en bruto de las fracciones proteináceas y no proteináceas. Una vez que se separan los polipéptidos peptídicos de otras proteínas, el péptido o polipéptido de interés puede purificarse además con el uso de técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o la purificación para homogeneidad). La expresión «polipéptido aislado» o «polipéptido purificado», tal como se usan en la presente, pretenden hacer referencia a una composición que se puede aislar de otros componentes, en donde el polipéptido se purifica a cualquier grado con respecto a su estado que se obtiene en forma natural. Un polipéptido purificado también hace referencia, por lo tanto, a un polipéptido que no se encuentra en el entorno en el cual se da de forma natural. Por lo general, «purificado/a» hará referencia a una composición de polipéptidos que se ha sometido a un fraccionamiento para remover diversos otros componentes y que conserva considerablemente su actividad biológica expresada. Cuando se use la expresión «considerablemente purificado/a», esta hará referencia a una composición de péptido o polipéptido en la que el polipéptido o péptido forme el componente principal de la composición, por ejemplo, que constituya alrededor del 50 %, alrededor del 60 %, alrededor del 70 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85%, alrededor del 90% o más de las proteínas en la composición.

Diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación serán de conocimiento del experto en la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o mediante desnaturalización térmica, seguido de centrifugación; cromatografía tal como cromatografía por afinidad (columnas de proteína A), intercambio iónico, filtración de gel, fase inversa, hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrofóbica; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de estas técnicas. Tal como se sabe de manera general en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que determinadas etapas pueden omitirse, e incluso así generar un método adecuado para la preparación de un polipéptido considerablemente purificado.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende los polipéptidos híbridos ActRIIB solubles aislados o proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB mezcladas con un portadora farmacéuticamente aceptable. Tales portadores farmacéuticamente aceptables son conocidos y el experto en la técnica los comprenderá, y se han descrito exhaustivamente (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990). Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluirse con fines de modificación, mantenimiento o conservación, por ejemplo, del pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el aroma, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. Tales

composiciones farmacéuticas pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo* del polipéptido. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, de modo no taxativo, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno sulfito sódico); soluciones amortiguadoras (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes espesantes (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones que forman sales (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); solventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes mejoradores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos (preferentemente cloruro de sodio o de potasio, manitol sorbitol)); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, complementado posiblemente con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. Otros ejemplos de vehículos son solución salina neutra amortiguada o solución salina mezclada con albúmina de suero. Otras composiciones farmacéuticas ilustrativas comprenden amortiguador Tris de pH de alrededor de 7.0-8.5 o amortiguador de acetato de pH de alrededor de 4.0-5.5, los cuales pueden incluir adicionalmente sorbitol o un sustituto adecuado de este. En una modalidad de la presente descripción, es posible preparar composiciones para ser almacenadas al mezclar la composición seleccionada con el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, supra) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, es posible formular la composición terapéutica como un liofilizado con excipientes adecuados tales como sacarosa. Un experto en la técnica determinará la composición farmacéutica óptima, por ejemplo, en función de la vía de administración que se pretenda emplear, la forma de administración

y la dosis deseada.

Cuando se contemple la administración parenteral, las composiciones farmacéuticas terapéuticas pueden encontrarse en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógenos que comprende el polipéptido ActRIIB deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un
 5 vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua destilada estéril en la que el polipéptido se formula como una solución isotónica estéril preservada en forma adecuada. En varias modalidades, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración inyectable se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente
 10 amortiguada. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. De manera adicional, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y
 15 permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

En varias modalidades, las composiciones farmacéuticas terapéuticas pueden formularse para su administración dirigida, con el uso de un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas con
 base en lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y
 20 liposomas. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y distearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible, por ejemplo, con base en la especificidad del órgano, la especificidad de la célula
 25 y la especificidad del organelo y se conoce en la técnica.

En varias modalidades, se contempla la administración oral de las composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas que se administran de este modo se pueden formular con o sin aquellos portadores que se utilizan normalmente en la composición de formas de dosificación
 solidas tales como comprimidos y cápsulas. En las formas de dosificación sólidas para
 30 administración oral (cápsulas, comprimidos, pastillas, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente descripción se pueden mezclar con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico, (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa,
 35 alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia, (3) humectantes, tal como glicerol, (4)

agentes desintegrantes, tal como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio, (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina, (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (8) absorbentes, tales como arcilla de caolín y bentonita, (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de estos y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y pastillas, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes amortiguadores. También es posible emplear composiciones sólidas similares como rellenos en cápsulas de gelatina blandas o duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como también polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tal 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 particular, aceite de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de estos. Aparte de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, aromatizantes y conservantes.

En varias modalidades, la administración tópica de las composiciones farmacéuticas, ya sea en la piel o en las membranas mucosas, se encuentra contemplada. Las formulaciones tópicas pueden incluir además uno o más de una amplia gama de agentes que se sabe que son eficaces como potenciadores de penetración de la piel o la capa córnea. Los ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, sulfóxido de dimetilo y azona. Los agentes adicionales pueden incluirse además para hacer que la formulación sea aceptable desde el punto de vista cosmético. Los ejemplos de estos son grasas, ceras, aceites, tintes, aromas, conservantes, estabilizantes y agentes tensioactivos. También se pueden incluir los agentes queratolíticos tales como aquellos conocidos en la técnica. Los ejemplos son ácido salicílico y azufre. Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, amortiguador o propelente que se puedan requerir. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un

compuesto en cuestión de la presente descripción (por ejemplo, una trap híbrida del ligando ActRIIB), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o mezclas de estos.

- 5 Las composiciones farmacéuticas adicionales contempladas para su uso en la presente incluyen formulaciones que implican polipéptidos en formulaciones de administración controlada o sostenida. Las técnicas para la formulación de una variedad de otros medios de liberación sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas por los expertos en la técnica.
- 10 Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica a utilizarse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación adecuados para el tratamiento variarán, en parte, según la molécula administrada, la indicación para la cual se esté usando el polipéptido, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y estado de salud general)
- 15 del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar de alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg o más, según los factores antemencionados. Preferentemente, las composiciones de polipéptidos pueden inyectarse o administrarse en forma intravenosa. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada
- 20 tres a cuatro días, todas las semanas o dos veces por semanas en función de la semivida y la tasa de depuración de la formulación específica. La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del polipéptido en la formulación en uso. Normalmente, se administrará una composición hasta alcanzar una dosificación que logre el efecto deseado. La composición puede, por lo tanto, administrarse como una dosis única o en múltiples dosis (en
- 25 concentraciones/dosificaciones iguales o diferentes) en el tiempo, o como una infusión continua. De manera rutinaria, se realiza un refinamiento adicional de la dosificación adecuada. Las dosificaciones adecuadas pueden determinarse mediante el uso de datos de respuesta a la dosis adecuados. La vía de administración de la composición farmacéutica coincide con métodos conocidos, por ejemplo, administración oral, inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral
- 30 (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, por vía intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea o intraperitoneal; así como por un medio intranasal, enteral, tópica, sublingual, uretral, vaginal o rectal, a través de sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos implantados. Cuando se desee, las composiciones se pueden administrar mediante inyección de bolo o continuamente mediante
- 35 infusión o dispositivos de implante. De manera alternativa o adicional, la composición se puede

administrar en forma local mediante el implante de una membrana, esponja u otro material adecuado que haya absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se utilice un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado y la administración de la molécula deseada puede realizarse mediante difusión, bolo de liberación gradual o administración continua.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de la atrofia muscular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de trastornos óseos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de trastornos metabólicos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de fibrosis en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmune/inflamatoria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de células cancerosas en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que

consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad renal en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de la artritis en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de la anorexia en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad hepática en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para la inducción del crecimiento de células madre para reparación tisular o regeneración de órganos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de la anemia en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del dolor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 y la

SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.

- 5 En varias modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del envejecimiento en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una trap híbrida del ligando ActRIIB mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la trap híbrida del ligando ActRIIB comprende un polipéptido ActRIIB-ECD soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que
- 10 consiste en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 29. En varias modalidades, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 44 se usa con un enlazador bisagra que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 118 para enlazar un Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 43) al polipéptido híbrido ActRIIB-ECD soluble de la composición farmacéutica.
- 15 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar de una forma más completa la descripción, pero no se interpreta que limiten el alcance de esta.

Ejemplo 1

Los polipéptidos de la presente descripción se pueden preparar de acuerdo con técnicas de ADN recombinante que resultan conocidas para el experto en la técnica. En este ejemplo, la preparación

20 de los polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles se describe en forma general.

Se diseñaron varios polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD mediante la sustitución de múltiples residuos de aminoácidos en posiciones selectivas dentro del dominio extracelular ActRIIB humano con los residuos de aminoácidos derivados del dominio extracelular ActRIIA humano en las posiciones correspondientes según la alineación de secuencia a nivel de aminoácido. Se generaron casetes de

25 expresión de ADN que codifican los polipéptidos ActRIIB-ECD híbridos mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio y se modificaron posteriormente en construcciones de proteínas de fusión Fc mediante la colocación en el marco de un fragmento de ADNc que codifica el péptido señal de cadena ligera de inmunoglobulina humana en el extremo 5' y un fragmento de ADN que codifica un enlazador peptídico seguido de un Fc humano en el extremo 3'.

Ejemplo 2

En este ejemplo, se describe en general la preparación de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB configuradas como se ilustra en la FIG. 1.

Se clonan casetes de ADN sintético que codifican varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB, donde cada una contiene una secuencia líder péptido señal (SEQ ID NO: 49 o 50), un polipéptido

35 híbrido ActRIIB-ECD soluble del Ejemplo 1 (o una secuencia ActRIIB-ECD de tipo salvaje), una

secuencia enlazadora peptídica (SEQ ID NO: 44), una secuencia enlazadora bisagra (SEQ ID NO: 118) y una secuencia de dominio Fc (SEQ ID NO: 39 o 41 o 43) en los vectores de expresión Freedom pCHO 1.0 y pcDNA3.1 (Life Technologies).

Para la transfección estable, cada uno de los vectores de expresión pCHO 1.0 que codifican las
 5 diversas proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB se transfectó en células CHO-S con el uso del reactivo FreeStyle MAX (Life Technologies). 48 horas luego de la transfección, se cultivaron las células en medio CD FortiCHO sin suero que contenía una selección de puromicina y metotrexato (MTX) durante 3-7 semanas a 37 °C en una incubadora con agitación en CO₂. Se generaron grupos estables hasta que las células superaron el 90 % de viabilidad con un contenido de puromicina 30
 10 M y metotrexato 500 nM. Se generaron clones estables mediante clonación con dilución siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante (Life Technologies). Para la transfección transitoria, se transfectó cada uno de los plásmidos de expresión pcDNA3.1 que codifican las diversas proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB en células Expi293 con el uso de un reactivo de transfección ExpiFectamine293 (Life Technologies).

15 Luego de la transfección, se cultivaron células CHO-S transfectadas en forma estable en medio completo CD FortiCHO sin suero complementado con glucosa a 37°C en una incubadora con agitación en CO₂ durante hasta 14 días. El medio acondicionado se recolectó para la purificación de proteínas. Se cultivaron células Expi293 transfectadas en forma transitoria en un medio de expresión Expi293 a 37 °C en una incubadora con agitación en CO₂ durante hasta 7 días y se recolectó el
 20 medio para la purificación de proteínas.

Para la purificación, se purificó medio acondicionado que contenía la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB mediante una columna de alto rendimiento con proteína A Hitrap mediante el uso de AKTA FPLC (GE Healthcare). Se eluyeron las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB con amortiguador de ácido acético (pH 3.6), neutralizado con Tris-HCl 1 M (pH 8.0) y luego se sometieron a intercambio
 25 de amortiguadores. Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el uso de un espectrofotómetro (Beckman).

Ejemplo 3

En este ejemplo, se evaluaron las actividades de unión a miostatina y BMP9 de siete proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB.

30 Se analizaron inicialmente las actividades de unión a miostatina y BMP9 de varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB con el uso de Octect Red (ForteBio). Se cargaron individualmente las proteínas purificadas o el medio acondicionado en biosensores AHC con una carga máxima. Luego de la fase de lavado de referencia, se expuso a los sensores a miostatina o BMP9 10 nM, respectivamente, para una etapa de asociación seguida por una etapa de disociación. Todos los
 35 experimentos se llevaron a cabo con agitación a 1,000 rpm. La actividad de unión se analizó con el

uso del software de ForteBio con un cálculo de KD utilizando la relación K_d/K_a .

Resultados

Se examinaron las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB en comparación con la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje para determinar las actividades de unión contra miostatina y BMP9. Los resultados indican que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB presentan una reducción notable en la afinidad de unión a BMP9 en comparación con la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje. Una cantidad de proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB demostraron una disminución drástica de las afinidades de unión a BMP9 que son más de 100 veces más débiles que las de la proteína ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje y mientras tanto, conservaron una potente afinidad de unión a la miostatina, que es similar a la de la proteína ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los datos de unión preliminares obtenidos mediante análisis Octet Red.

Tabla 3

ActRIIB-ECD-polipéptido	Unión a miostatina	Unión a BMP9
Tipo salvaje	+++	+++
AG-0003 (SEQ ID NO: 5)	+++	++
AG-0005 (SEQ ID NO: 7)	+++	+
AG-0006 (SEQ ID NO: 8)	+++	+
AG-0007 (SEQ ID NO: 9)	+++	+
AG-0008 (SEQ ID NO: 10)	+++	++
AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	+++	N.D.
AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	+++	N.D.

+++ KD $<10^{-8}$ M

++ KD: 10^{-6} - 10^{-7} M

+ KD 10^{-4} - 10^{-6} M

N.D. Unión no detectable

Se analizaron AG-0014 y AG-0027 mediante ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Sapidyne Instruments, Inc.). Se acoplaron en forma separada 20-30 $\mu\text{g/ml}$ de miostatina, activina A o BMP-9 a perlas Sepharose 4 Fast Flow activadas con NHS (GE Healthcare) utilizando procedimientos experimentales recomendados por Sapidyne Instruments. La concentración para cada proteína trap híbrida del ligando ActRIIB se mantuvo constante a medida que se tituló el ligando en una dilución en serie de 2.5. Se permitió que las soluciones alcanzaran el equilibrio mediante incubación a temperatura ambiente durante hasta 24 horas y posteriormente se pasaron a través de una celda de flujo preempacada con perlas Sepharose recubiertas con ligando en una máquina KinExA 3000 (Sapidyne Instruments). Se detectaron las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB libres

capturadas en las perlas mediante el anticuerpo antihumano Fc de cabra marcado con Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Se calcularon los valores de afinidad de unión al ligando (K_D) con el uso del software KinExA Pro (Sapidyne Instruments).

Resultados

- 5 En la Tabla 4 se muestra un resumen de los datos de unión preliminares obtenidos mediante análisis KinExA. Los datos indican que, de manera similar a ActRIIB-Fc de tipo salvaje, las dos proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB ilustrativas tienen afinidades elevadas tanto por la miostatina como por la activina A en un intervalo de un único dígito de pM. Sin embargo, ninguna de las dos proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB muestran unión detectable a BMP9, en oposición a ActRIIB-Fc de tipo salvaje, que muestra una potente afinidad de unión por BMP9 en el intervalo de un único dígito de pM.

Tabla 4

Molécula	Miostatina	Activina A	BMP9
	K_D (pM)	K_D (pM)	K_D (pM)
WT ActRIIB-Fc	5.06 pM	1.38 pM	4.25 pM
AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	8.75 pM	0.357 pM	Sin unión
AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	7.87 pM	1.09 pM	Sin unión

Ejemplo 4

- En este ejemplo, se describen un ensayo de señalización de miostatina/activina A y un ensayo de señalización de BMP9, que se usaron para cuantificar las actividades de bloqueo de miostatina/activina A y la actividad de bloqueo de BMP9, respectivamente, de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB.

- Para evaluar la señalización de miostatina/activina A, se clonó una construcción informante con 12 repeticiones de la secuencia CAGA (Dennler et ál, EMBO 17: 3091-3100, 1998) en un vector informante pGL3-luc (Promega). Se transfectó de manera estable el vector modificado pGL3-CAGA₁₂-luc en células C2C12 para generar una línea celular informante de luciferasa, C2C12-CAGA-luc, capaz de detectar la señalización de Smad3/4 mediada por miostatina o activina A. Para medir las actividades de neutralización de miostatina y activina A, se preincubaron 4 nM de miostatina o activina A recombinante con concentraciones crecientes de varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB así como una proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje (como testigo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron las mezclas de reacción a los cultivos celulares de C2C12-CAGA-luc. Luego de incubación durante 5 horas en una

incubadora en CO₂ a 37 °C, se midieron las actividades de luciferasa de los cultivos informantes C2C12-CAGA-luc con el uso de LuminoSkan Ascent (Thermo Scientific).

Se evaluó la señalización de BMP9 en células C2C12 que se habían transfectado en forma estable con un informante de luciferasa que contenía un elemento de respuesta a BMP (BRE, por sus siglas en inglés) que detecta la señalización de Smad1/5/8 (Korchynski et ál, J. Biol. Chem. 277:4883-4891, 2002). Específicamente, se sintetizó un elemento de respuesta a BMP con dos repeticiones (Briter et ál, PLoS One, 2012) y se clonó en el vector pGL3-luc (Promega). Luego se transfectó de manera estable el vector pGL3-2XBRE-luc en células C2C12. Se utilizó una línea celular informante transfectada en forma estable, C2C12-BRE-luc, para cuantificar la señalización de Smad1/5/8 mediada por BMP9. Para medir la actividad de neutralización de BMP, se preincubaron 4 nM de BMP9 con concentraciones crecientes de varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB así como una proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje (a modo de testigo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregaron las mezclas de reacción a los cultivos celulares de C2C12-BRE-luc. Luego de 5 horas de incubación a 37 °C en una incubadora con CO₂, se midieron las actividades de luciferasa de los cultivos informantes C2C12 BRE-luc mediante el uso de Luminoskan Ascent (Thermo Scientific).

Resultados

Los resultados revelaron que, en comparación con la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje, dos proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB ilustrativas conservaron potentes actividades de neutralización de miostatina y activina A pero tuvieron notables disminuciones en la actividad de neutralización de BMP9 (véase la Figura 2). La Figura 2 muestra las actividades de neutralización celular contra la miostatina, activina A y BMP9 para dos proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB ilustrativas, AG-0003 (SEQ ID NO: 5) y AG-0005 (SEQ ID NO: 7), en comparación con las de la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje testigo.

Ejemplo 5

En este Ejemplo, se usaron el ensayo de señalización de miostatina/activina A y el ensayo de señalización de BMP9 que se describen en el Ejemplo 4 para cuantificar las actividades de bloqueo de miostatina/activina A y la actividad de bloqueo de BMP9, respectivamente, de las siguientes proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB: AG-0003 (SEQ ID NO: 5), AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0025 (SEQ ID NO: 27), AG-0027 (SEQ ID NO: 29), AG-0028 (SEQ ID NO: 30), AG-0029 (SEQ ID NO: 31) y AG-0035 (SEQ ID NO: 37).

Resultados

Los resultados revelaron que, en comparación con la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje, varias de estas proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB conservaron potentes actividades de neutralización de miostatina y activina A pero tuvieron notables disminuciones en la actividad de

neutralización de BMP9. La Figura 3 muestra las actividades de neutralización celular contra miostatina, activina A y BMP9 para dos proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB ilustrativas, AG-0014 y AG-0027, en comparación con aquellas de la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje testigo.

5 Y tal como se muestra en las Tablas 5 y 6, en comparación con la proteína de fusión ActRIIB-ECD-Fc de tipo salvaje (WT ActRIIB-Fc), varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB ilustrativas presentaron una reducción drástica de la actividad de neutralización de BMP9 en un ensayo informante celular de Smad1/5/8 BRE-luc, mientras que se conservó una fuerte actividad de neutralización contra la miostatina, activina A y activina B en un ensayo informante celular de Smad2/3 CAGA-luc. La Tabla 5 muestra los valores de IC₅₀ sobre la neutralización celular contra la miostatina, activina A, activina B y BMP9 de AG-0014 y AG-0027, respectivamente, en comparación con los de WT ActRIIB-Fc. La Tabla 6 esboza las actividades de neutralización de BMP9 y miostatina de varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB ilustrativas en comparación con las de WT ActRIIB-Fc. En comparación con WT ActRIIB-Fc, las proteínas híbridas AG-0003, AG-0004, AG-0005, AG-0014, AG-0023, AG-0024, AG-0025, AG-0027 y AG-0028 demostraron una reducción significativa o prácticamente ninguna actividad de neutralización de BMP9 (véase también la Figura 10); AG-0003, AG-0005, AG-0014 y AG-0027 conservaron una actividad de neutralización de miostatina total, mientras que AG-0004, AG-0023, AG-0024, AG-0025 y AG-0028 presentaron una pérdida en la actividad de neutralización de miostatina (véase también la Figura 11). En general, estos resultados demuestran la capacidad de varias proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB de bloquear preferentemente la señalización de Smad2/3 mediada por miostatina/activina con un mínimo o ningún impacto en la señalización de Smad1/5/8 mediada por BMP9.

Tabla 5

	<u>IC₅₀ celular (nM)</u>			
	contra miostatina	contra activina A	contra activina B	contra BMP9
WT ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 1)	1.24.	1.27.	1.04.	3.40.
AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	0.95.	1.15.	2.10.	N.D.
AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	1.14.	1.62.	1.30.	N.D.

N.D.: Actividad neutralización no detectable

83
Tabla 6

	Mutación de dominio extracelular ActRIIB	Actividad de neutralización de BMP9	Actividad de neutralización de miostatina
5	WT ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 1)	Tipo salvaje	++++
	AG-0003 (SEQ ID NO: 5)	F58I+Q64T+E65D +A68E+T69K+E70K +E71D+N72S+Q74E	++++
10	AG-0004 (SEQ ID NO: 6)	F58I+Q64T+E65D +A68E+T69K+E70K +E71D+N72S	++
	AG-0005 (SEQ ID NO: 7)	Q64T+E65D +A68E+T69K+E70K +E71D+N72S	++++
15	AG-0007 (SEQ ID NO: 9)	A68E+T69K+E70K +E71D+N72S+Q74E	++
	AG-0008 (SEQ ID NO: 10)	A68E+T69K+E70K +E71D+N72S	+++
	AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	E26Y+E28D+Q29K +L33R	++++
20	AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	E28D+F58I+E70K	++++
	AG-0029 (SEQ ID NO: 31)	E28D	++
	AG-0024 (SEQ ID NO: 26)	F58I	++++
25	AG-0023 (SEQ ID NO: 25)	E70K	+
	AG-0028 (SEQ ID NO: 30)	E28D+E70K	+
	AG-0025 (SEQ ID NO: 27)	F58I+E70K	+++
30	AG-0035 (SEQ ID NO: 37)	E28D+F58I	+++

++++: Actividad de neutralización total; +++: Actividad de neutralización parcial; ++: Actividad de neutralización débil; +: Actividad de neutralización muy débil; +/-: Poca o ninguna actividad de neutralización; -: Sin actividad de neutralización.

Ejemplo 6

En este Ejemplo, se evaluaron los efectos en el peso corporal y la masa muscular en ratones macho C57Bl/6 de 9 semanas a los que se inyectó en forma subcutánea PBS (Vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje, AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a la dosificación de 10 mg/kg, una vez a la semana. Se registraron los pesos corporales en el día 0, el día 5, el día 12 y el día 18. n=6/8 por grupo. Se calcularon los valores para el cambio de peso corporal como el porcentaje de aumento de peso respecto a la referencia en el día 0. Se realizó disección a los músculos de la pantorrilla de cada animal y se pesaron durante la necropsia terminal. Se expresaron los valores como el porcentaje de aumento de la masa muscular promedio de la pantorrilla en cada grupo de tratamiento en comparación con los del grupo con vehículo. Tal como se ilustra en las Figuras 4 y 5 y en la Tabla 7, la administración de cada una de las dos proteínas trap híbridas del ligando ilustrativas permite un incremento notorio en el aumento de peso corporal en los ratones, de una forma similar a ActRIIB-Fc de tipo salvaje.

Tabla 7

Aumento de peso corporal respecto a la referencia

Grupos	Día 5	Día 12	Día 18
Vehículo	1.5 %	3.9 %	5.6 %
WT ActRIIB-Fc	9.4 %	20.1 %	25.8 %
AG-0014	9.0 %	16.8 %	25.2 %
AG-0027	7.1 %	18.1 %	24.3 %

Tal como se ilustra en la Figura 5 y en la Tabla 8, la administración de las dos proteínas trap híbridas del ligando ilustrativas, AG-0014 y AG-0027, respectivamente, permite un incremento notorio en la masa muscular en los ratones, de una forma similar a ActRIIB-Fc de tipo salvaje.

Tabla 8

Aumento de masa muscular en comparación con el vehículo

Grupos	Aumento en masa muscular de pantorrilla en comparación con el vehículo
5 WT ActRIIB-Fc	31.3 %
AG-0014	30.0 %
AG-0027	30.7 %

Ejemplo 7

10 En el presente Ejemplo, se evaluaron los efectos en la permeabilidad con Evans Blue en cavidad abdominal de ratón, testículos de ratón y tejido pulmonar de ratón en ratones macho BalbC de 8 semanas tratados con PBS (vehículo), ActRIIB-Fc de tipo salvaje, AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29), respectivamente, a la dosificación de 10 mg/kg, una vez a la semana. Dos semanas después del tratamiento, se inyectaron 200 µl de tinte Evans Blue (0.5 % en PBS, pH 7.2)

15 en cada grupo de animales (n=4) mediante la vena de la cola. Se llevó a cabo una necropsia 90 min después de la inyección del tinte Evans Blue. Se muestran imágenes representativas de cavidad abdominal expuesta por cirugía, órgano testículo disecado y tejido pulmonar disecado de cada grupo, tal como se etiqueta en las Figuras 6-8, respectivamente. El color azul indica el derrame de vasos sanguíneos. Se pesaron los tejidos pulmonares y testículos y luego se colocaron

20 individualmente en viales que contenían formamida para extraer el tinte Evans Blue. Luego de la incubación a 55 °C durante 24 horas, se centrifugaron las muestras. Se midió la absorbancia de la fase acuosa de cada muestra a la longitud de onda de 610 nm con el uso de un espectrofotómetro. Se muestran las cantidades de tinte Evans Blue extravasado por mg de tejido pulmonar húmedo (panel izquierdo) y tejido de testículo (panel derecho) en diferentes grupos de tratamiento en la

25 Figura 9.

Cabe destacar que, tal como se ilustra en las Figuras 6-9, la administración de las dos proteínas trap híbridas del ligando ilustrativas disminuyó notoriamente el nivel de derrame en los vasos sanguíneos en comparación con la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje en todos los tejidos evaluados en los animales tratados.

Ejemplo 8

Se llevó a cabo un análisis ELISA automático para caracterizar adicionalmente la unión a BMP9 de las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB a diferentes concentraciones en comparación con ActRIIB ECD-Fc de tipo salvaje y ActRIIA ECD-Fc de tipo salvaje. Tal como se muestra en la Figura 12, los datos revelan que las dos proteínas híbridas ilustrativas, AG-0014 y AG-0027,

35 respectivamente, presentaron una fuerte reducción de la unión a BMP9 en comparación con WT

ActRIIB-Fc o WT ActRIIA-Fc. Estos datos indican que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB tienen una selectividad destacable en la unión a BMP9 que difiere de WT ActRIIB-Fc y WT ActRIIA-Fc.

Ejemplo 9

5 En este Ejemplo, se evaluaron las diferencias entre las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29) y ActRIIB-Fc de tipo salvaje de referencia, con una mención especial a su impacto potencial en la integridad vascular y las hemorragias en los lechos ungueales en ratones hembra 129S1/SvImJ.

10 Se separaron 24 ratones hembra adultos jóvenes 129S1/SvImJ (Jackson Laboratory) en 4 grupos experimentales (n=6 por grupo) y se trataron posteriormente con vehículo (PBS) o con una dosis alta repetida de ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT), AG-0027 y AG-0014, respectivamente, con el uso de las pautas de dosificación que se muestran en la Tabla 9 a continuación:

Tabla 9

15	Grupo (n=6)	Compuesto	Dosis	Frecuencia	Duración	Vía
	1.	Vehículo (PBS)	-	Dos veces por semana	4 semanas	SC
	2.	WT- ActRIIB-Fc	30 mg/kg	Dos veces por semana	4 semanas	SC
20	3.	AG-0027	30 mg/kg	Dos veces por semana	4 semanas	SC
	4.	AG-0014	30 mg/kg	Dos veces por semana	4 semanas	SC

25 Luego de 4 semanas de tratamiento, se colocó a cada animal en un recipiente de fondo transparente y se examinó en busca de cualquier señal de hemorragia en los lechos ungueales de la pata con el uso de un microscopio invertido.

Tal como se muestra en la Figura 13, el examen microscópico de la morfología general reveló que en cada uno de los seis ratones 129S1/SvImJ que fueron tratados con una dosis elevada repetida de ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT-ActRIIB-Fc) prácticamente todos los lechos ungueales de las patas tuvieron una clara señal de hemorragia (Figura 13, segundo panel). En oposición, no se observaron señales de hemorragia en los lechos ungueales de las patas en los ratones 129S1/SvImJ que fueron tratados con una dosis elevada repetida de cualquiera de las dos proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB. La morfología de los lechos ungueales de las patas en los ratones tratados con trap híbrida del ligando ActRIIB pareció similar a la de los animales testigo tratados con vehículo.

35 Estos hallazgos indican que el compuesto de referencia de ActRIIB-Fc de tipo salvaje alteró la

vasculatura y generó hemorragias en los lechos ungueales, mientras que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB no interfirieron con la homeostasis vascular y mantuvieron la integridad vascular normal en los lechos ungueales.

Tomados en conjunto, los resultados del presente ejemplo demuestran que la dosis alta repetida de WT-ActRIIB-Fc administrada SC a 30mg/kg, dos veces por semana, durante 4 semanas, condujo a claras señales de hemorragia en los lechos ungueales de las patas y las glándulas de Brunner en ratones hembra 129S1/SvImJ. En oposición, 4 semanas de dosis alta repetida del tratamiento con AG-0027 o AG-0014 no generó señales de hemorragia en los lechos ungueales en los ratones hembra 129S1/SvImJ. Por lo tanto, las moléculas trap híbridas del ligando ActRIIB no tuvieron una influencia negativa en la integridad de los vasos sanguíneos como sí la tuvo ActRIIB-Fc de tipo salvaje. Estos hallazgos demuestran que las moléculas trap híbridas del ligando ActRIIB difieren drásticamente de ActRIIB-Fc de tipo salvaje con respecto a la selectividad *in vivo* y, a diferencia de ActRIIB-Fc de tipo salvaje que altera la vasculatura, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB mantienen la integridad normal de la vasculatura sin interferir con la homeostasis vascular. Como tal, con una selectividad *in vivo* y eficacia *in vivo* superiores (véanse los ejemplos a continuación), las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB claramente ofrecen ventajas terapéuticas distintivas en cuanto a seguridad y eficacia respecto a ActRIIB-Fc de tipo salvaje o cualquier molécula de última generación similar.

Ejemplo 10

En el presente Ejemplo, se evaluó la eficacia *in vivo* de AG-0027 (SEQ ID NO: 29) en la mejora de la masa muscular y la densidad ósea, así como la capacidad de AG-0027 de revertir la atrofia muscular y la pérdida ósea inducidas por privación de andrógenos en ratones con orquiectomía C57BL/6.

Se inyectó en forma subcutánea a 18 ratones macho C57BL/6 de 10 semanas, inclusive 6 ratones testigo normales y 12 ratones con orquiectomía (ORX) (Charles River Laboratory) con vehículo (PBS, pH7.4) o AG-0027, utilizando las pautas de dosificación que se muestran en la Tabla 10 a continuación:

Tabla 10

Grupo	Ratones	n	Tratamiento	Dosis	Frecuencia	Vía	Duración
1.	Normal	6.	Vehículo	-	2X/semana	SC	6 semanas
2.	ORX	6.	Vehículo	-	2X/semana	SC	6 semanas
3.	ORX	6.	AG-0027	10 mg/kg	2X/semana	SC	6 semanas

Se registraron los pesos corporales longitudinales dos veces por semana a lo largo del período de tratamiento de 6 semanas. En el día 42, se practicó una eutanasia a los ratones con asfixia por CO₂.

Se disecaron los tejidos de cada animal, inclusive el esquelético magro, corazón y músculos individuales de las patas traseras (gastrocnemio, cuádriceps y sóleo), así como el fémur y las vértebras lumbares. Se pesaron el esquelético magro, el corazón y los pares de músculos de patas traseras individuales (derecho e izquierdo) con el uso de balanzas digitales, registrándose los valores. Se analizaron los tejidos óseos, inclusive el fémur distal y la 4° vértebra lumbar, de cada animal mediante tomografía microcomputada de alta resolución (microCT, por sus siglas en inglés) con el uso de un sistema de generación de imágenes de microCT. Se calcularon el volumen óseo (BV/TV, %), el número trabecular (Tb.N, mm⁻¹), el grosor trabecular (Tb.Th, mm) y la separación trabecular (Tb.Sp, mm) del fémur distal y la 4° vértebra lumbar según los escaneos consecutivos de microCT de las 6 muestras de fémur y hueso lumbar de cada grupo.

Tal como se muestra en la Figura 14, los datos de peso corporal (panel izquierdo) indican que los ratones ORX C57BL/6 tuvieron una reducción notoria en el peso corporal en comparación con los ratones testigo normales C57BL/6. Dentro de una semana de tratamiento, AG-0027 condujo a la reversión total de la pérdida de peso en ratones ORX (panel izquierdo) y la administración de AG-0027 produjo un aumento de peso corporal estadísticamente significativo, sostenido y rápido en comparación con los ratones ORX tratados con vehículo y los ratones testigo normales (véase el panel derecho).

La Figura 15 muestra los cambios en la masa muscular de las patas traseras individuales y los pesos de esqueléticos magros. Los datos indican que el grupo ORX tratado con vehículo tuvo una pérdida significativa de masa muscular de las patas traseras de 9 %-13 % y una pérdida de masa esquelética magra de casi 14 % en comparación con el grupo testigo normal. En oposición, el grupo ORX tratado con AG-0027 demostró un aumento notorio en la masa muscular de las patas traseras de 22 %-47 % y en la masa esquelética magra de casi 37 % en comparación con el grupo ORX tratado con vehículo y también demostró un aumento significativo en la masa muscular de las patas traseras de 11 %-28 % y en la masa esquelética magra de 18 % en comparación con el grupo testigo normal. Resulta destacable que AG-0027 no solo revirtió completamente la atrofia muscular en ratones ORX, también generó un potente aumento muscular en los ratones ORX tratados que superó el nivel en el grupo testigo normal. En el grupo ORX tratado con vehículo, hubo una pérdida significativa tanto de músculos de contracción rápida (es decir, gastrocnemio y cuádriceps) como de contracción lenta (es decir, sóleo) y el tratamiento con AG-0027 revirtió eficazmente la pérdida de ambos de estos tipos musculares en los ratones ORX (véase la Figura 15). Estos hallazgos demuestran que AG-0027 tiene una potente eficacia in vivo en el crecimiento muscular y es muy capaz de revertir la atrofia muscular.

La Figura 16 y la Figura 17 también muestran los resultados del análisis microCT de la densidad ósea en el fémur distal (Figura 16) y la 4° vértebra lumbar (Figura 17) en ratones testigo normales,

ratones ORX tratados con vehículo y ratones ORX tratados con AG-0027. Tal como se muestra en la Figura 18, los ratones ORX mostraron una notable pérdida de masa ósea en el fémur distal con disminuciones estadísticamente significativas en la fracción de volumen óseo (BV/TV, %) y el número trabecular (Tb.N, mm⁻¹) en el fémur distal de >86 % y un aumento pronunciado en la separación trabecular (Tb.Sp, mm) de 144 % en comparación con ratones testigo normales; sin embargo, el tratamiento de los ratones ORX con AG-0027 aumentó dramáticamente la fracción de volumen óseo (BV/TV, %) un 726 % y el número trabecular (Tb.N, mm⁻¹) un 667 % y disminuyó la separación trabecular (Tb.Sp, mm) un 51 %, lo que de este modo revierte totalmente la pérdida de densidad ósea del fémur distal en ratones ORX, producto de la privación de andrógenos. Además, tal como se muestra en los datos de microCT, el tratamiento con AG-0027 aumenta significativamente el grosor trabecular del fémur distal en ratones ORX un 11 % más que el nivel de testigo normal observado en ratones normales. Tal como se muestra en la Figura 17, la privación de andrógenos inducida por la orquiectomía condujo a una pérdida notoria de masa ósea en las vértebras lumbares en los ratones ORX, lo cual se revirtió completamente con el tratamiento con AG-0027 (véase la Figura 17). Específicamente, los ratones ORX tratados con vehículo mostraron disminuciones estadísticamente significativas en la fracción de volumen óseo (BV/TV, %) y el número trabecular (Tb.N, mm⁻¹) en la 4^ª vértebra lumbar de aproximadamente 50 % en comparación y también una disminución estadísticamente significativa en (Tb.Sp, mm) de 33 % en comparación con los ratones testigo normales; sin embargo, el tratamiento de los ratones ORX con AG-0027 aumentó dramáticamente la fracción de volumen óseo lumbar un 148 % y el número trabecular lumbar un 110 % y disminuyó la separación trabecular lumbar (Tb.Sp, mm) un 23 %, lo que de este modo mejora completamente la pérdida pronunciada de la densidad ósea lumbar en ratones ORX, producto de la privación de andrógenos. Además, el tratamiento con AG-0027 aumentó significativamente el grosor trabecular de la columna lumbar en ratones ORX a 19 % más del valor testigo normal observado en ratones normales. Estos datos demuestran que AG-0027 tiene un potente efecto óseo anabólico *in vivo* y que el tratamiento con AG-0027 es muy eficaz para revertir la pérdida ósea.

En resumen, los datos en el presente ejemplo para los ratones ORX muestran que la administración subcutánea de AG-0027 condujo a un aumento drástico en el peso corporal, la masa muscular y la masa ósea y revirtió completamente la atrofia muscular y la pérdida ósea profunda debido a la privación de andrógenos. La destacable eficacia *in vivo* en el anabolismo muscular y óseo demuestra que AG-0027 es un terapéutico de última generación que ofrece un fuerte potencial terapéutico para el tratamiento de varios trastornos musculares y óseos.

Ejemplo 11

La diabetes es un gran problema de salud pública que se aproxima a las proporciones epidémicas

en el mundo. Se ha demostrado que el aumento de la masa y la función muscular con ejercicio puede mejorar la sensibilidad a la insulina y mejorar las condiciones diabéticas. Los datos en los ejemplos que anteceden establecen claramente que una trap híbrida del ligando ActRIIB tal como AG-0027 (SEQ ID NO: 29) es capaz de mejorar potentemente el crecimiento muscular y la regeneración muscular al antagonizar selectivamente la vía de señalización de Smad2/3 mediada por miostatina/activina. En el presente Ejemplo, se evaluó la influencia del crecimiento muscular en el metabolismo de la glucosa con el uso de ratones diabéticos tratados con AG-0027 o vehículo.

Se trataron ratones homocigotas db/db diabéticos (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) con AG-0027 a dosis crecientes de hasta 30 mg/kg o con vehículo (PBS, pH 7.4) durante 10 o 12 semanas y se usaron ratones heterocigotas db/db como testigo no diabético (n=6 por grupo). Se evaluaron cambios en la ingesta de alimentos, el consumo de agua, el volumen de orina en 24 horas, la glucosa en sangre en ayuno y el peso corporal. Al final del estudio, se practicó una eutanasia a los ratones con CO₂. Se recolectaron muestras de sangre y se midieron los niveles de insulina en suero, HbA1c, adiponectina con el uso de kits para ensayos disponibles en el mercado. Se determinaron las composiciones corporales, inclusive grasa abdominal, masa muscular y masa grasa parda mediante análisis por necropsia. Se evaluó la histología de los tejidos hepáticos con tinción H&E y tinción Oil-Red O.

La Figura 18 muestra el efecto del tratamiento con AG-0027 en la ingesta de alimentos, el consumo de agua, el volumen de orina en 24 horas y los niveles de glucosa en ayuno en ratones diabéticos db/db. La administración subcutánea de la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB AG-0027 normalizó drásticamente el consumo de alimentos, la ingesta de agua, el volumen de orina en 24 horas y los niveles de glucosa en ayuno en los ratones diabéticos db/db. Por lo tanto, los datos indican que el bloqueo farmacológico de la señalización de Smad2/3 mediada por miostatina/activina en ratones diabéticos db/db puede mejorar las disfunciones metabólicas ya que se halló que el tratamiento con la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB reduce eficazmente la ingesta de alimentos y el consumo de agua, disminuye el nivel de glucosa en sangre y reduce el volumen de orina en 24 horas. El tratamiento también mejoró el hígado graso en ratones db/db. Por lo tanto, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB como AG-0027 parecen ofrecer un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades metabólicas, inclusive diabetes, nefropatía diabética, síndrome metabólico, obesidad e hígado graso.

Ejemplo 12

En el presente Ejemplo, se evalúa la eficacia in vivo de AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29) en el aumento de peso corporal y crecimiento muscular en comparación con ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT-ActRIIB-Fc) como referencia en ratones C57Bl/6.

Se trataron de manera subcutánea ratones hembra C57BL/6 de siete semanas (n=6 por grupo) con

una única inyección de Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29), Trap B híbrida (AG-0014; SEQ ID NO: 16) y ActRIIB-Fc de tipo salvaje (WT-ActRIIB-Fc) a 10 mg/kg, respectivamente, o con una única inyección de vehículo (PBS). El peso corporal registrado hasta 14 días luego de la inyección individual demostró que el tratamiento con AG-0027 y AG-0014 generó un aumento de peso igualmente potente en comparación con WT-ActRIIB-Fc (Figura 19). Se llevó a cabo el análisis de necropsia terminal en el día 14 y los datos demostraron que el tratamiento con AG-0014 y AG-0027 produjo aumentos significativos en la masa de los tres músculos individuales evaluados de las patas traseras, inclusive el gastrocnemio, el cuádriceps y el sóleo, al mismo nivel que WT-ActRIIB-Fc de referencia (Figura 20). Estos datos demuestran que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB como AG-0014 y AG-0027 pueden presentar una eficacia total in vivo en el crecimiento muscular en comparación con ActRIIB-Fc de tipo salvaje.

Ejemplo 13

En el presente Ejemplo, se evalúa la eficacia in vivo dependiente de la dosis de AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29) en la mejora de aumento de peso corporal y el crecimiento del músculo esquelético en ratones C57Bl/6.

Se trataron de manera subcutánea ratones hembra C57BL/6 de seis semanas con dosis individuales en aumento de Trap A híbrida (AG-0027; SEQ ID NO: 29) y Trap B híbrida (AG-0014 (SEQ ID NO: 16), respectivamente, a 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg. Se registraron el peso corporal y el cambio en el peso corporal respecto a la referencia en ratones tratados con PBS y tratados con Trap híbrida hasta los 8 días posinyección. Los datos de peso corporal demuestran que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB AG-0014 y AG-0027 pueden estimular el aumento de peso corporal de una forma dependiente de la dosis (Figura 21). El análisis de necropsia terminal de los pesos de los músculos de las patas traseras demuestra además que el tratamiento con AG-0014 o AG-0027 produjo aumentos estadísticamente significativos en la masa muscular del gastrocnemio (A) y en la masa muscular de los cuádriceps (B) de una forma dependiente de la dosis. Estos datos demuestran que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB como AG-0014 y AG-0027 pueden estimular el crecimiento muscular de una forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 14

La distrofia muscular es un grupo de enfermedades muy debilitantes que generan una debilidad progresiva y pérdida de masa muscular, así como fragilidad en los huesos. Los datos en los ejemplos que anteceden establecen claramente que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB tal como AG-0014 (SEQ ID NO: 16) y AG-0027 (SEQ ID NO: 29) son capaces de potenciar fuertemente el crecimiento muscular, la regeneración muscular y la formación ósea en ratones MDX, un modelo de enfermedad de distrofia muscular de Duchenne, al antagonizar selectivamente la vía de señalización de Smad2/3 mediada por miostatina/activina. En este Ejemplo, se evalúa el potencial terapéutico

de AG-0014 y AG-0027 para el tratamiento de la distrofia muscular.

Se obtuvieron ratones macho C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J (mdx) de 4 semanas y ratones C57BL/10ScSn de tipo salvaje de la misma edad de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Se separaron los ratones mdx en grupos equilibrados según el peso corporal de acuerdo con sus pesos corporales y posteriormente se los trató con AG-0027 (n=8) a una dosis de 10mg/kg o con inyecciones estériles de PBS (n=8) administradas en forma subcutánea una vez por semana durante 12 semanas. Se usaron ratones C57BL/10ScSn de la misma edad (n=6) como testigos de tipo salvaje sin tratamiento. Se pesó a los ratones dos veces por semana longitudinalmente y se determinó la composición corporal al comienzo (semana 1) y al final del estudio (semana 12). Se evaluó la fuerza de agarre de las extremidades delanteras semanalmente con un medidor de la fuerza de agarre de BIOSEB (Bioseb) mediante la colocación del animal en una rejilla horizontal y se le permitió que empujara alejándose del investigador mediante el uso de sus patas delanteras. Al final del estudio, se les practicó una eutanasia a los animales con CO₂ y se recolectaron y pesaron los tejidos individuales, inclusive el músculo esquelético magro, cuádriceps, gastrocnemio, sóleo y diafragma. Se recolectaron muestras de suero en sangre de todos los ratones experimentales mediante perforación cardíaca para cuantificar los niveles de creatina cinasa (CK) con el uso del kit de prueba de creatina cinasa Pointe Scientific (Fisher Scientific). Los datos indican que las proteínas trap híbridas (AG-0027 y AG-0014) mejoraron eficientemente el aumento de peso corporal, la masa muscular y la fuerza de agarre en ratones MDX (Figuras 24 y 25). Tal como se muestra en la Figura 24, la administración subcutánea de las proteínas trap híbridas (AG-0027 y AG-0014) condujo a un aumento sostenido en el peso corporal en ratones MDX de una manera estadísticamente significativa. El tratamiento produjo aumentos notorios y estadísticamente significativos de la masa de los músculos de las patas traseras de los ratones MDX (gastrocnemio, sóleo y cuádriceps) un 18 %-36 % más que los testigos tratados con vehículo (véase la Figura 25). Además, el tratamiento aumentó significativamente la fuerza de agarre de los ratones MDX un 47-56 %. El tratamiento también produjo una reducción drástica y estadísticamente significativa de los niveles de CK en suero en ratones mdx (véase la Figura 27), lo que indica que el tratamiento mejoró la reparación muscular y redujo el daño muscular. Además, los análisis de microCT revelaron que el tratamiento aumentó el volumen óseo trabecular un 168 % en el fémur distal y 48 % en la columna lumbar en los ratones MDX (véanse las Figuras 28 y 29). Por lo tanto, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB tales como AG-0014 y AG-0027 pueden promover el crecimiento muscular, aumentar la fuerza muscular, mejorar la reparación muscular y potenciar la densidad ósea en ratones MDX. Tomados en conjunto, estos datos indican que las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB tales como AG-0014 y AG-0027 tienen un potencial terapéutico para combatir la distrofia muscular, inclusive, de modo no taxativo, la distrofia muscular de Duchenne.

Ejemplo 15

Las activinas (activina A, activina B y activina AB) se regulan por aumento en muchos estados de enfermedades inflamatorias. Las activinas elevadas en circulación cumplen un papel importante en la inflamación. En el presente Ejemplo, el efecto antiinflamatorio de AG-0027 (SEQ ID NO: 29) se evalúa con el uso de un modelo de ratón de endotoxemia en donde se determina la capacidad de AG-0027 de atenuar la inducción de citocinas proinflamatorias y la mortalidad inducida por lipopolisacáridos (LPS).

Para evaluar los niveles de citocina proinflamatoria en suero, se agruparon aleatoriamente ratones macho BALB/c de cuatro semanas (Charles River Laboratory) en 3 grupos (n= 8) para recibir el vehículo (PBS pH 7.4) o tratamiento con AG-0027. Para el testigo de referencia, se sacrificó al 1° grupo de ratones sin tratamiento con CO₂ y se analizaron los niveles de citocina en suero basal. Al 2° y 3° grupo se les dio una inyección subcutánea de AG-0027 (20 mg/kg) o vehículo una hora antes de la inmunización LPS. Luego se inyectó LPS (400 µg/kg) i.p. una hora después. Noventa minutos después de la inyección de LPS, se practicó una eutanasia a todos los animales con CO₂ para recolectar muestras de sangre y se determinaron los niveles en suero de citocinas proinflamatorias, inclusive activina A, TNF-alfa, IL-6 e IL-17 mediante ensayos Luminex. Para evaluar el efecto protector de trap híbrida del ligando ActRIIB contra la endotoxemia inducida por LPS, se ubicaron aleatoriamente 40 ratones macho BALB/c en un grupo testigo y un grupo tratado con AG-0027 (n=20). Una hora antes de la inmunización con LPS, se inyectó en forma subcutánea AG-0027 (20 mg/kg) a un grupo y al otro con vehículo. Una hora después del tratamiento, se inyectó a ambos grupos con LPS (30 mg/kg, i.p.) y se controlaron las tasas de supervivencia de los ratones dos veces al día comenzando inmediatamente después de la administración de LPS hasta 7 días después de la inyección con LPS. Los datos indican que la captura farmacológica de activinas puede atenuar la inducción mediada por LPS de citocinas proinflamatorias y reducir la tasa de mortalidad en ratones con endotoxemia inducida por lipopolisacáridos. Por lo tanto, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB como AG-0027 tienen potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Ejemplo 16

La fibrosis es una condición de enfermedad grave y progresiva que afecta muchos órganos diferentes, inclusive pulmón, riñón, corazón, hígado, médula ósea, tracto GI, piel y músculo esquelético y puede generar insuficiencia orgánica. La activación de la vía de señalización Smad2/3 por activina se ha visto implicada en la patogénesis de la fibrosis. En este Ejemplo, se evalúa el potencial terapéutico de AG-0027 (SEQ ID NO: 29) por su capacidad de contrarrestar la fibrosis en ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, un modelo de enfermedad ampliamente usado para el estudio de posibles terapias para la fibrosis.

Se induce la fibrosis pulmonar en ratones macho C57BL/6 de 6 semanas (Charles River Laboratory) con una instilación intratraqueal de bleomicina (Calbiochem) a la dosificación de 3 U/kg. Luego se trató a la mitad de los ratones con AG-0027 a 10mg/kg un día después de la instilación con bleomicina y nuevamente en los días 5, 9 y 12, y la otra mitad de los ratones se trató con vehículo (PBS, pH 7.4) (n=8) en los mismos días. A modo de testigo normal, se trataron ratones macho C57BL/6 de la misma edad (n=6) con vehículo. En el día 14, se practicó una eutanasia a los ratones. Se recolectaron las muestras de sangre y de tejido pulmonar para cuantificar la gravedad de la fibrosis mediante examen histológico de las calificaciones para fibrosis y la medición de los niveles de hidroxiprolina y contenido de colágeno. Los datos indican que el bloqueo de las acciones de las activinas puede atenuar eficazmente la fibrosis inducida por bleomicina. Por lo tanto, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB como AG-0027 parecen ofrecer un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades fibróticas.

Ejemplo 17

La osteogénesis imperfecta (OI) es una enfermedad genética muy debilitante caracterizada por la fragilidad ósea, fracturas frecuentes y atrofia muscular por desuso. Se ha demostrado que la activación de la vía de señalización de Smad2/3 puede cumplir un papel importante en la patogénesis y el avance de la OI. En el presente Ejemplo, se evalúa la eficacia de AG-0027 (SEQ ID NO: 29) en el tratamiento de la pérdida ósea y la atrofia muscular por desuso en la osteogénesis imperfecta.

Se investigan ratones homocigotas B6C3Fe a/a Col1a2oim/J, un modelo preclínico de enfermedad de OI. Específicamente, se obtienen ratones macho homocigotas de B6C3Fe a/a Col1a2oim/J oim/oim de ocho semanas (ratones OI) y ratones testigo normales de la misma camada de tipo salvaje, de la misma edad, de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Los ratones OI se agrupan en dos grupos según la aleatorización de los pesos corporales así como la masa ósea medida por absorciometría de rayos X con doble energía (DEXA). Se trataron 24 ratones homocigotas Col1a2oim (n=12 por grupo) con AG-0027 (15 mg/kg, i.p.) o con vehículo (PBS, pH7.4) una vez por semana durante 6 semanas. A modo de testigos, se trataron 20 ratones testigo de tipo salvaje de la misma camada (n=10 por grupo) con AG-0027 (15 mg/kg, i.p.) o vehículo una vez por semana durante 6 semanas. Se midieron longitudinalmente los pesos corporales semanalmente durante 6 semanas. Para evaluar la masa ósea, se anestesiaron ratones OI homocigota y ratones testigo de tipo salvaje de la misma camada y se sometieron a escaneos de DEXA (Lunar PIXImus) para medir la densidad mineral ósea y el contenido al comienzo e inmediatamente antes de la finalización del experimento. Al final del estudio, se practicó una eutanasia a los animales con CO₂, se recolectaron los músculos tríceps, cuádriceps y gastrocnemios y se pesaron. Se recolectaron muestras de sangre de todos los ratones experimentales mediante perforación cardíaca, se recolectaron los sueros para

su análisis de marcadores de recambio óseo, inclusive los marcadores de formación ósea propéptido de extremo N procolágeno tipo 1 (P1NP), fosfatasa alcalina específica de hueso (BAP) y osteocalcina (OC) y marcadores de reabsorción ósea tales como telopéptido C de colágeno tipo 1 (CTX-1). Se recolectaron los fémures y cuartas vértebras lumbares y se evaluaron los volúmenes óseos con un sistema de generación de imágenes microtomográfico (μ CT, Skyscan, Kontich, Bélgica). Los datos demostraron que la administración subcutánea de la proteína trap híbrida del ligando ActRIIB permite una mejora drástica tanto en el crecimiento muscular como en la formación ósea en ratones OI (ratones oim/oim). El tratamiento con AG-0027 (SEQ ID NO: 29) aumentó significativamente la masa muscular esquelética un 34 % en los tríceps y un 51 % en el gastrocnemio en ratones OI (véase la Figura 30). Además, tal como se revela mediante escaneos DEXA, el tratamiento aumentó drásticamente BMD y BMC en forma significativa, un 14.6 % y 36 %, respectivamente (véase la Figura 31). Además, tal como se muestra mediante análisis microCT, el tratamiento aumentó el volumen óseo trabecular un 251 % en el fémur distal y 98 % en la columna lumbar en los ratones OI (ratones oim/oim) (véanse las Figuras 32 y 33). Resulta destacable que, con las mejoras en la masa muscular y la masa ósea, el tratamiento también pareció normalizar la baja estatura al mejorar la longitud del cuerpo de los ratones OI (Figura 34). Por lo tanto, se halló que la inhibición farmacológica de la señalización de Smad2/3 por miostatina/activina con la trap híbrida del ligando ActRIIB AG-0027 es muy eficaz para revertir la pérdida ósea y la atrofia muscular por desuso, así como para mejorar la baja estatura en los ratones OI. Por lo tanto, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB como AG-0027 tienen un potencial terapéutico para el tratamiento de la OI.

Las indicaciones conjuntas de la presente descripción demuestran que las proteínas trap híbridas novedosas del ligando ActRIIB descritas en la presente se unen potentemente y neutralizan múltiples citocinas que inducen la atrofia. Y, cabe destacar, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB mejoraron drásticamente la selectividad para los músculos, es decir, mientras que bloquearon potentemente las acciones de las citocinas que inducen a la atrofia muscular, dejan intacta la señalización de citocinas no relacionadas con músculos, por lo que conserva la función fisiológica normal de las células no musculares. Tal como se estableció anteriormente, BMP cumple un importante papel en una cantidad de procesos fisiológicos y se ha demostrado que la señalización de BMP9 es esencial para mantener una vasculatura/permeabilidad sanguínea normal. Al evitar la señalización de BMP9 y preferentemente antagonizar la señalización de la miostatina y activina, las proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB de la presente descripción ofrecen un tratamiento más eficaz y seguro que las proteínas de ActRIIB solubles existentes, lo cual neutraliza potentemente BMP-9, es decir, al dirigirse selectivamente a múltiples citocinas que inducen la atrofia en paralelo y evitar la interferencia con la señalización de las citocinas no relacionadas con músculos, estas

proteínas trap híbridas del ligando ActRIIB representan una clase de candidatos clínicos provistos de una eficacia superior en el crecimiento muscular y un perfil de seguridad mejorado, y de este modo ofrecen el potencial de volverse el mejor tratamiento para combatir la atrofia muscular y/o trastornos óseos asociados con el desarrollo de una cantidad de patologías crónicas, neurológicas, genéticas, inflamatorias, fibróticas o infecciosas.

Todos los artículos y métodos descritos y reivindicados en la presente se pueden realizar y llevar a la práctica sin experimentación indebida en virtud de la presente descripción. Si bien los artículos y métodos de la presente descripción se han descrito en cuanto a las modalidades preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los artículos y métodos sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción. Todas dichas variaciones y equivalentes evidentes para el experto en la técnica, ya sea que existan actualmente o se desarrollen posteriormente, se consideran dentro del espíritu y alcance de la descripción, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Todas las patentes, solicitudes de patentes y las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva indican los niveles de los expertos en la técnica a la que se refiere la descripción. Todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia, a todos los efectos, y en la misma medida que si se hubiese indicado específica e individualmente la incorporación de cada publicación individual en su totalidad mediante referencia, a todos los efectos. La descripción descrita de manera ilustrativa en la presente se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos no descritos específicamente en la presente. Por lo tanto, debe entenderse que si bien la presente descripción ha sido descrita específicamente mediante las modalidades preferidas y las características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a realizar modificaciones y variaciones a los conceptos en la presente, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente descripción tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que se enumeran en el listado de secuencias adjunto se muestran con el uso de abreviaciones con letras estándares para las bases de nucleótidos y el código de tres letras para los aminoácidos, tal como se define en el capítulo 37 del C.F.R., 1.822.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB-ECD humano tipo salvaje trunco.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIA-ECD humano tipo salvaje trunco.

Las SEQ ID NO: 3-37 son las secuencias de aminoácidos de varios polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles.

La SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-1 (IgG1) humana.

La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de IgG1.

La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de
5 inmunoglobulina gamma-2 humana.

La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de IgG2.

La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-4 humana.

La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de IgG4.

10 La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico.

La SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa del polipéptido ActRIIB humano

La SEQ ID NO: 46 es la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular ActRIIB de tipo salvaje humano (19-134 de la SEQ ID NO: 45)

15 La SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa del polipéptido ActRIIA humano.

La SEQ ID NO: 48 es la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular ActRIIA de tipo salvaje humano (20-135 de la SEQ ID NO: 47)

La SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos de un péptido señal natural ActRIIB.

20 La SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos de un péptido señal de cadena ligera de inmunoglobulina.

Las SEQ ID NO: 51-117 son las secuencias de aminoácidos de varios polipéptidos híbridos ActRIIB-ECD solubles.

La SEQ ID NO: 118 es la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

ActRIIB-ECD trunco de tipo salvaje

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLD

30 DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ
ID NO: 1)

ActRIIA-ECD trunco de tipo salvaje

ETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW

35 LDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP

(SEQ ID NO: 2)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0001)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD

5 RTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 3)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0002)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD

RTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 4)

10

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0003)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD

RTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 5)

15 hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0004)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD

RTDCVEKKDSPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 6)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0005)

20 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD

RTDCVEKKDSPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 7)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0006)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD

25 RTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 8)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0007)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD

RQECVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 9)

30

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0008)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD

RQECVEKKDSPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 10)

35 ActRIIA-ECD híbrido humano (AG-0009)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 11)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0010)

5 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 12)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0011)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
10 RQECVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 13)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0012)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTGVEPCYGDQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 14)
15

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0013)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTGVEPCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 15)

20 hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0014)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 16)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0015)

25 ETRECIYYNANWEKDRTNQTGVEPCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 17)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0016)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTGVEPCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
30 RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 18)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0017)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 19)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0018)

ETQECIYYNANWEKDRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 20)

5 hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0019)

ETRECIYYNANWEKDRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 21)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0020)

10 ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 22)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0021)

15 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWRNSSGTIELVKQGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 23)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0022)

20 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 24)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0023)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 25)

25 hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0024)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 26)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0025)

30 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD
RQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 27)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0026)

35 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDKDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDR
QECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 28)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0027)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD
RQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 29)

5

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0028)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 30)

10 hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0029)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 31)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0030)

15 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD
RQECVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0031)

20 ETRECIFFNANWEKDRTNQTGVPECEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 33)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0032)

25 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIELVKQGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 34)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0033)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 35)

30 hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0034)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 36)

hu-ActRIIB-ECD híbrido (AG-0035)

35 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD

RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 37)

Región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-1 humana

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

5 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

10

Dominio Fc de IgG1

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

15 HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

Región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-2 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
20 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

25 Dominio Fc de IgG2

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

30

Región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma-4 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
35 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 42)

Dominio Fc de IgG4

5 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 43)

10 Secuencia enlazadora peptídica
GGGGS (SEQ ID NO: 44)

Secuencia de aminoácidos de longitud completa del polipéptido ActRIIB humano

MTAPWVALALLWGS LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYAS
15 WRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTY
EPPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLE
IKARGRFGCVWKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEV
ELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSK
NVLLKSDLTAVLADFG LAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMG
20 LVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCV
TIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO:
45)

Dominio extracelular de ActRIIB humano de tipo salvaje (19-134 de SEQ ID NO: 45)

25 SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLD
DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTY EPPPTAPT (SEQ
ID NO: 46)

Secuencia de aminoácidos de longitud completa del polipéptido humano ActRIIA

30 MGAATKLAFAVFLISSGAILGRSETQECIYYNANWEKDKTNRSGIEPCYGDKDKRRHCFATW
KNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRND CIEKKDSPEVFFCCCEGNMCNERFFYFPEMEVTQPTSNPV
TPKPPLFNTLLYSLVPIMGIAVIVLFSFWMYRHHKLAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLMGLK
PLQLEIKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEIYSLPGMKHDNILQFIGAEKRG
SIDVDLWLITAFHEKGS LDFLKANVVS WNECHIAQT MARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKS
35 KNVLLKNNLTACIADFG LALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMG

LVLWELASRCTASDGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVLRECWQKHSGMAMLC
ETIEECWDHDAEARLSAGCVEERIIQMQLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESSL (SEQ ID NO:
47)

5 Dominio extracelular de ActRIIA humano de tipo salvaje (20-135 de SEQ ID NO: 47)

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 48)

10 Péptido señal natural de ActRIIB:

MTAPWVALALLWGSLCAG (SEQ ID NO: 49)

Péptido señal de cadena ligera de inmunoglobulina:

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 50)

15

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETQECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 51)

20 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETQECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 52)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

25 ETRECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 53)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

30 ETQECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 54)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 55)

35

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 56)

5 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRQE
CVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 57)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

10 ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD
CVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 58)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

15 ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRQE
CVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 59)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD
CVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 60)

20

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD
CVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 61)

25

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD
CVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 62)

30 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD
CVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 63)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

35 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDFNCYDRTD

CVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 64)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDFNCYDRQE

5 CVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 65)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHICYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDRT

DCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 66)

10

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHICYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDRT

DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 67)

15 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD

CVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 68)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

20 ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD

CVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 69)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD

25 CVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 70)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT

DCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 71)

30

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHICYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDRT

DCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 72)

35 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRT
DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 73)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

5 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKQGCWLDDFNCYDRT
DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 74)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWLDDFNCYDRT
10 DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 75)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIELVKKGCWLDDFNCYDRT
DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 76)
15

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIEIVKKGCWLDDFNCYDRT
DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 77)

20 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIEIVKQGCWLDDFNCYDRT
DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 78)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

25 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRT
DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 79)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
30 ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 80)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 81)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 82)

5 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 83)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

10 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 84)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

15 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKQGCWLDDFNCYDR
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 85)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 86)

20

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIELVKKGCWLDDFNCYDR
QECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 87)

25 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGSIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 88)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

30 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 89)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

35 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKQGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 90)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVETEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 91)

5

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 92)

10 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 93)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

15 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEDNPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 94)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

20 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEESPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 95)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

25 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 96)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVETEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 97)

30 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEKDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 98)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

35 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ

ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 99)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDKDKRLHCYASWRNSSGTIELVKQGCWLDDFNCYDRQ

5 ECVAKKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 100)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDKDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKQGCWLDDFNCYDRQ

ECVAEKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 101)

10

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDQDKRLHCYASWRNSSGSIEIVKQGCWLDDFNCYDRQ

ECVAKKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 102)

15 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEKDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWLDDFNCYDRQ

ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 103)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

20 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR

QECVATEENPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 104)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR

25 QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 105)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGEQDKRLHCYASWRNSSGSIEIVKKGCWLDDFNCYDRT

DCVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 106)

30

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGSIELVKKGCWLDDFNCYDR

QECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 107)

35 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 108)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

5 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGSIEIVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 109)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWLDDFNCYDRQ
10 ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 110)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGSIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 111)
15

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 112)

20 hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 113)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

25 ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 114)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWLDDFNCYDRQ
30 ECVAKKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 115)

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTD
CVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 116)
35

hu-ActRIIB-ECD híbrido

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYD
RQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 117)

- 5 Secuencia enlazadora peptídica
 ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 118)