

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 123**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 08725055 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **25.11.2009 EP 2120999**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de Activina-Actrlla y uso de las mismas en la prevención o el tratamiento de mieloma múltiple**

30 Prioridad:

09.02.2007 US 900580 P

31.05.2007 US 932762 P

26.06.2007 US 937365 P

25.10.2007 US 52807 P

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

22.01.2013

73 Titular/es:

ACCELERON PHARMA, INC. (100.0%)

128 SIDNEY STREET

CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

KNOFF, JOHN;

SEEHRA, JASBIR y

KUMAR, RAVINDRA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 123 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de Activina-ActRIIa y uso de las mismas en la prevención o el tratamiento del mieloma múltiple

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Trastornos de los huesos, que comprenden desde osteoporosis a fracturas, representan una serie de estados patológicos para los cuales existen pocos agentes farmacéuticos eficaces. En lugar de ello, el tratamiento está enfocado a intervenciones físicas y conductuales, que incluyen inmovilización, ejercicio y cambios de dieta. Sería beneficioso contar con agentes terapéuticos que promuevan el crecimiento de los huesos y el aumento de la densidad ósea para el propósito de tratar una diversidad de trastornos óseos.

10 El crecimiento y la mineralización de los huesos dependen de las actividades de dos tipos de células, osteoclastos y osteoblastos, aunque los condrocitos y las células de la vasculatura participan también en aspectos críticos de estos procesos. A lo largo del desarrollo, la formación de hueso ocurre por dos mecanismos, osificación endocondral y la osificación intramembranosa, siendo responsable la primera de la formación longitudinal de hueso y responsable la última de la formación de huesos topológicamente planos, tales como los huesos del cráneo. La osificación endocondral requiere la formación y degradación secuenciales de estructuras cartilaginosas en las placas de crecimiento que sirven como moldes para la formación de osteoblastos, osteoblastos, la vasculatura y la mineralización subsiguiente. Durante la osificación intramembranosa, el hueso se forma directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y la deposición subsiguiente en la matriz.

20 Las fracturas y otras disrupciones estructurales de hueso se curan por un proceso que, al menos superficialmente, se asemeja a la secuencia de sucesos de osteogénesis durante el desarrollo, que incluye la formación de tejido cartilaginoso y mineralización subsiguiente. El proceso de curación de las fracturas puede ocurrir de dos maneras. La curación directa o primaria del hueso ocurre sin formación de callo. La curación indirecta o secundaria del hueso ocurre con una etapa precursora de callo. La curación primaria de las fracturas implica la reformación de la continuidad mecánica por una disrupción estrechamente unida. En condiciones adecuadas, las células de reabsorción ósea que rodean la disrupción exhiben una respuesta de reabsorción con efecto túnel y establecen caminos para la penetración de vasos sanguíneos y curación subsiguiente. La curación secundaria de los huesos sigue un proceso de inflamación, formación de callo blando, mineralización del callo y remodelación del callo. En la etapa de inflamación, se producen hematoma y hemorragia como consecuencia de la disrupción de vasos sanguíneos periósticos y endosteales en el sitio de la lesión. Las células inflamatorias invaden el área. En la etapa de formación de callo blando, las células producen nuevos vasos, fibroblastos, material intracelular y células de soporte, formando tejido de granulación en el espacio comprendido entre los fragmentos de la fractura. La unión clínica a través de la disrupción es establecida por tejido fibroso o cartilaginoso (callo blando). Se forman osteoblastos y median la mineralización del callo blando, que es reemplazado después por hueso laminar y sometido a los procesos normales de remodelación.

35 Además de las fracturas y otras disrupciones físicas de la estructura ósea, la pérdida de contenido mineral y masa ósea puede estar causada por una gran diversidad de condiciones y puede dar como resultado problemas médicos importantes. Los cambios de la masa ósea ocurren de una manera relativamente predecible a lo largo de la vida de un individuo. Hasta una edad aproximada de 30 años, los huesos tanto de los hombres como de las mujeres crecen hasta su masa máxima por crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondral y crecimiento radial. Después de aproximadamente los 30 años (para hueso trabecular, v.g. huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y la edad de 40 (para hueso cortical, v.g. los huesos largos encontrados en las extremidades), ocurre pérdida lenta de hueso tanto en los hombres como en las mujeres. En las mujeres, se produce además una fase final de pérdida sustancial de hueso, debido probablemente a deficiencias de estrógenos post-menopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y 25% del compartimiento trabecular. Si la pérdida progresiva de hueso da como resultado una condición patológica tal como la osteoporosis, 45 ello depende en gran parte de la masa ósea inicial del individuo y de si existen condiciones exacerbantes.

La pérdida de hueso se caracteriza a veces como un desequilibrio en el proceso de remodelación normal del hueso. El hueso sano está sujeto constantemente a remodelación. La remodelación comienza con la reabsorción de hueso por los osteoclastos. El hueso reabsorbido es reemplazado luego por nuevo tejido óseo, que se caracteriza por 50 formación de colágeno por los osteoblastos, y calcificación subsiguiente. En los individuos sanos, las tasas de reabsorción y formación están equilibradas. La osteoporosis es una condición progresiva crónica, marcada por un desplazamiento hacia la reabsorción, que da como resultado una disminución global de masa ósea y mineralización del hueso. La osteoporosis en los humanos va precedida por osteopenia clínica (densidad mineral ósea que es mayor que una desviación estándar pero menor que 2,5 desviaciones estándar por debajo del valor medio para el hueso de un adulto joven). En todo el mundo, aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de sufrir 55 osteoporosis.

Así pues, el control del equilibrio entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos, puede ser útil para promover la curación de las fracturas y otras lesiones del hueso así como el tratamiento de trastornos, tales como osteoporosis, asociados con pérdida de masa ósea y mineralización del hueso.

Con respecto a la osteoporosis, estrógenos, calcitonina, osteocalcina con vitamina K, o dosis elevadas de calcio dietético se utilizan todos ellos como intervenciones terapéuticas. Otros enfoques terapéuticos para la osteoporosis incluyen bisfosfonatos, hormona paratiroidea, calcimiméticos, estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio, y fluoruro de sodio. Sin embargo, tales agentes terapéuticos están asociados a menudo con efectos secundarios indeseables.

Así pues, es un objeto de la presente descripción proporcionar composiciones para la prevención y el tratamiento del mieloma múltiple como se indica en las reivindicaciones 1-12.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proposición farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActR11a-Fc expresada por las células CHO, en la cual la proteína de fusión ActR11a-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos que tienen cada uno una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90% o 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, unidos por enlace disulfuro, y en la cual el dímero tiene entre 3 y 5 restos de ácido siálico.

La proteína de fusión ActR11a-Fc puede ser un dímero formado por dos polipéptidos de SEQ ID NO: 7, y uno o ambos polipéptidos pueden tener opcionalmente un aminoácido menos en los términos amino o carboxi que se muestran en SEQ ID NO: 7. La proteína de fusión ActR11a-Fc puede expresarse recombinantemente en células CHO utilizando la secuencia conductora TPA de SEQ ID NO: 9. El dímero puede tener 4 restos de ácido siálico.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión ActR11a-Fc tiene una semivida en suero de 25 a 32 días como promedio en humanos sanos normales y biodisponibilidad equivalente cuando se administra por vía intravenosa o subcutánea. La composición farmacéutica del primer aspecto puede ser adecuada para administración subcutánea. Preferiblemente, la proteína de fusión ActR11a-Fc tiene una pureza de al menos 90% con respecto a otros componentes proteínicos. La proteína de fusión ActR11a-Fc puede incluir uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico, y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico. La composición farmacéutica del primer aspecto puede comprender adicionalmente un agente bisfosfonato, que puede seleccionarse de alendronato, ibandronato, y risedronato.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActR11a-Fc para uso en el tratamiento o la prevención del mieloma múltiple en un paciente humano, en donde la composición farmacéutica es una composición farmacéutica del primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de una proteína de fusión ActR11a-Fc para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del mieloma múltiple en un paciente humano, en donde la proteína de fusión ActR11a-Fc es una proteína de fusión ActR11a-Fc como se define en el primer aspecto de la invención.

En parte, se describe en esta memoria que moléculas que tienen actividad antagonista de activina o ActR11a-Fc ("antagonistas de activina" y "antagonistas de ActR11a", colectivamente "antagonistas de activina-ActR11a") pueden utilizarse para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento óseo, y/o aumentar la resistencia de los huesos. En particular, se describe en esta memoria que una forma soluble de ActR11a actúa como un inhibidor de la señalización de Activina-ActR11a y promueve el incremento de la densidad ósea, el crecimiento óseo, y la resistencia ósea in vivo. Si bien la mayoría de los agentes farmacéuticos que promueven el crecimiento del hueso o inhiben la pérdida ósea actúan como agentes anti-catabólicos (a los que se hace referencia comúnmente también como "agentes catabólicos") (v.g., bisfosfonatos) o agentes anabólicos (v.g., hormona paratiroidea, PTH, cuando se dosifican adecuadamente), la proteína ActR11a soluble exhibe actividad dual, teniendo a la vez efectos anti-catabólicos y anabólicos. Así pues, se describe en esta memoria que los antagonistas del camino de señalización activina-ActR11a pueden utilizarse para aumentar la densidad ósea y promover el crecimiento óseo. Si bien la ActR11a soluble puede afectar al hueso por un mecanismo distinto del antagonismo de activina, puede ser deseable que se seleccionen agentes terapéuticos sobre la base de una actividad antagonista de Activina-ActR11a. Como se describe en esta memoria, los antagonistas de Activina-ActR11a son eficaces en la prevención y/o la reparación del deterioro óseo causado por tumores de mieloma múltiple y tumores de mama, y, adicionalmente, que los antagonistas de Activina-ActR11a disminuyen la carga tumoral en el mieloma múltiple. El polipéptido ActR11a soluble promueve el crecimiento óseo sin causar un aumento medible consistentemente en la masa muscular.

Se describen en esta memoria métodos para utilización de antagonistas de Activina-ActR11a, que incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActR11a fijadores de activina, anticuerpos anti-activina, anticuerpos anti-ActR11a, moléculas pequeñas direccionadas a activina o ActR11a y aptámeros, y ácidos nucleicos que disminuyen la expresión de activina y ActR11a, para tratar trastornos asociados con la densidad ósea baja o resistencia ósea baja, tales como osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes que se encuentran en necesidad de ello, por ejemplo en pacientes que sufren una fractura ósea. Se describen en esta memoria polipéptidos que comprenden un polipéptido soluble ActR11a fijador de activina, que se fija a activina. Los polipéptidos ActR11a pueden formularse

como una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido ActRIIa fijador de activina y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el polipéptido ActRIIa fijador de activina se fija a activina con una K_D menor que 1 micromolar o menor que 100, 10 ó 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIa fijador de activina fija selectivamente activina frente a GDF11 y/o GDF8, y preferiblemente con una K_D que es al menos 10 veces, 20 veces o 50 veces menor con respecto a activina que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Si bien no se desea quedar ligados a ningún mecanismo de acción particular, es de esperar que este grado de selectividad para inhibición de activina con respecto a la inhibición de GDF11/GDF8 justifique el efecto selectivo sobre el hueso sin un efecto consistentemente medible sobre el músculo. Un polipéptido ActRIIa puede seleccionarse para causar menos de 15%, menos de 10% o menos de 5% de aumento en el músculo a dosis que alcanzan efectos deseables sobre el hueso. Preferiblemente, la composición tiene al menos una pureza de 95% con respecto a otros componentes polipéptidos, como se evalúa por cromatografía de exclusión de tamaños, y más preferiblemente la composición tiene una pureza de al menos 98%. Un polipéptido ActRIIa fijador de activina para uso en la invención puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90%, 95%, 97% o 99% a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Un polipéptido ActRIIa fijador de activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIa natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 ó 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 1-3 o una secuencia de SEQ ID NO: 2, que carece de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola").

Un polipéptido ActRIIa soluble, fijador de activina puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (v.g., en el dominio de fijación de ligando) con relación a un polipéptido ActRIIa existente naturalmente. Ejemplos de polipéptidos ActRIIa alterados se proporcionan en WO 2006/012627, pp. 59-60. La alteración de la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, insecto, u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con relación al polipéptido ActRIIa existente naturalmente.

Un polipéptido ActRIIa fijador de activina puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIa (v.g., una porción de fijación de ligando de un ActRIIa) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, direccionamiento a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede aumentar una o más de estabilidad in vivo, semivida in vivo, absorción/administración, localización tisular o formación de distribuciones de complejos proteínicos multimerización de la proteína de fusión, y/o purificación. La dimerización o multimerización puede proporcionar actividad incrementada de fijación de ligando. Una proteína de fusión ActRIIa fijadora de activina puede incluir un dominio de inmunoglobulina Fc (de tipo salvaje o mutante) o una porción seroalbúmina u otro polipéptido que proporcione propiedades deseables tales como farmacocinética mejorada, solubilidad aumentada o estabilidad mejorada. Típicamente, una proteína de fusión ActRIIa-Fc de la invención se producirá como un complejo homodímero. Opcionalmente, una fusión ActRIIa-Fc comprende un enlazador relativamente desestructurado posicionado entre el dominio Fc y el dominio extracelular ActRIIa. Este enlazador desestructurado puede corresponder a la región desestructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo del terminal C del dominio extracelular de ActRIIa (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos o una longitud comprendida entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente exentos de estructura secundaria, o una mezcla de ambos. Un enlazador puede ser rico en residuos glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una secuencia simple de treonina/serina y glicinas o secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (v.g., singuletes o repeticiones TG_4 o SG_4). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un marcador epitópico, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina, y una fusión GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIa soluble incluye uno o más residuos de aminoácido modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico, y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se utiliza para tratar un trastorno óseo. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente exenta de pirógenos. En general, es preferible que una proteína ActRIIa se exprese en una línea de células de mamífero que medie adecuadamente la glicosilación natural de la proteína ActRIIa de tal modo que disminuya la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente humano, y se han utilizado satisfactoriamente líneas de células CHO, esperándose que sean útiles otros sistemas de expresión de mamífero comunes.

Como se describe en esta memoria, las proteínas ActRIIa designadas ActRIIa-Fc tienen propiedades deseables, que incluyen fijación selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11, alta afinidad de fijación de ligando y semivida en suero mayor que dos semanas en modelos animales. Se describen en esta memoria polipéptidos ActRIIa-Fc y preparaciones farmacéuticas que comprenden tales polipéptidos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se dan a conocer en esta memoria ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIa soluble fijador de activina. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido ActRIIa soluble fijador de activina, tal como se ha descrito arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia codificante para un dominio extracelular (v.g., dominio de fijación de ligando) de un ActRIIa y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembranal y/o el dominio citoplásmico de un ActRIIa, excepto por un codón de parada posicionado dentro del dominio transmembranal o el dominio citoplásmico, o posicionado entre el

dominio extracelular y el dominio transmembranal o dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótidos ActR11a de longitud total tal como SEQ ID NO: 4 ó 5, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo adicionalmente dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción al menos 600 nucleótidos antes del término 3' o posicionado de otro modo tal que la traducción del polinucleótido da lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una porción truncada de un ActR11a de longitud total. Una secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO: 14. Los ácidos nucleicos dados a conocer en esta memoria pueden estar enlazados operativamente a un promotor para expresión, y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

Se dan a conocer también en esta memoria métodos para producir un polipéptido ActR11a soluble fijador de activina. Un método de este tipo puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (v.g., SEQ ID NO: 4, 5 ó 14) dados a conocer en esta memoria en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Un método de este tipo puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido ActR11a soluble, en donde dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActR11a soluble; y b) recuperar el polipéptido ActR11a soluble así expresado. Los polipéptidos ActR11a solubles pueden recuperarse como fracción bruta, parcialmente purificada o altamente purificada. La purificación puede realizarse por una serie de pasos de purificación, que incluyen, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (v.g., Q sefarosa), cromatografía de interacción hidrófoba (v.g., fenilsefarosa), cromatografía de exclusión de tamaños, y cromatografía de intercambio catiónico.

Un antagonista de activina-ActR11a dado a conocer en esta memoria, tal como un polipéptido ActR11a soluble fijador de activina, puede utilizarse en un método para promover el crecimiento óseo o aumentar la densidad ósea en un individuo. El tratamiento de un trastorno asociado con densidad ósea baja, o para promover el crecimiento óseo, en pacientes que se encuentran en necesidad de ello puede comprender la administración a un individuo que se encuentra en necesidad de ello de una cantidad eficaz de antagonista de activina-ActR11a. Se describen también usos de un antagonista de activina-ActR11a para fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en esta memoria.

Un método para identificación de un agente que estimula el crecimiento de hueso, o la mineralización incrementada del mismo, puede comprender: a) identificación de un agente de test que se fija a activina o un dominio de fijación de ligando de un polipéptido ActR11a; y b) evaluación del efecto del agente sobre el crecimiento de hueso, o la mineralización del mismo, (que no es parte de la invención).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la purificación de ActR11a-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un solo pico, bien definido.

La Figura 2 muestra la fijación de ActR11a-hFc a activina y GDF-11, como se mide por el ensayo Biacore™.

La Figura 3 muestra un esquema para el Ensayo del Gen Informador A-204. La figura muestra el vector Informador: pGL3 (CAGA) 12 (descrito en Dennler et al., 1998, EMBO 17:3091-3100.) El motivo CAGA 12 está presente en genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para factores de señalización por Smad 2 y 3.

La Figura 4 muestra los efectos de ActR11a-hFc (rombos) y ActR11a-mFc (cuadrados) sobre la señalización de GDF-8 en el Ensayo del Gen Informador A-204. Ambas proteínas exhibían inhibición sustancial de la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares.

La Figura 5 muestra los efectos de tres preparaciones diferentes de ActR11a-hFc sobre la señalización de GDF-11 en el Ensayo del Gen Informador A-204.

La Figura 6 muestra ejemplos de imágenes DEXA de ratones BALB/c de control y tratados con ActR11a-mFc, antes (paneles superiores) y después (paneles inferiores) del periodo de tratamiento de 12 semanas. Un sombreado más pálido indica densidad ósea incrementada.

La Figura 7 muestra una cuantificación de los efectos de ActR11a-mFc sobre la densidad mineral ósea en ratones BALB/c a lo largo del periodo de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (rombos), dosificación de 2 mg/kg de ActR11a-mFc (cuadrados), dosificación de 6 mg/kg de ActR11a-mFc (triángulos) y dosificación de 10 mg/kg de ActR11a-mFc (círculos).

La Figura 8 muestra una cuantificación de los efectos de ActR11a-mFc sobre el contenido mineral óseo en ratones BALB/c a lo largo del periodo de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (rombos), dosificación de 2 mg/kg de ActR11a-mFc (cuadrados), dosificación de 6 mg/kg de ActR11a-mFc (triángulos) y dosificación de 10 mg/kg de ActR11a-mFc (círculos).

La Figura 9 muestra una cuantificación de los efectos de ActR11a-mFc sobre la densidad mineral ósea del hueso trabecular en ratones C57BL6 ovariectomizados (OVX) o falsamente operados (SHAM) después de un periodo de 6 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS) o dosificación de 10 mg/kg de ActR11a-mFc (ActR11a).

5 La Figura 10 muestra una cuantificación de los efectos de ActR11a-mFc sobre el hueso trabecular en ratones C57BL6 ovariectomizados (OVX) a lo largo de un periodo de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS; barras claras) o dosificación de 10 mg/kg de ActR11a-mFc (ActR11a; barras oscuras).

La Figura 11 muestra una cuantificación de los efectos de ActR11a-mFc sobre el hueso trabecular en ratones C57BL6 falsamente operados después de 6 ó 12 semanas de periodo de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS; barras claras) o dosificación de 10 mg/kg de ActR11a-mFc (ActR11a; barras oscuras).

10 La Figura 12 muestra los resultados del análisis pQCT de densidad ósea en ratones ovariectomizados a lo largo de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS; barras claras) o ActR11a-mFc (barras oscuras) eje y: mg/ccm.

15 La Figura 13 representa los resultados del análisis pQCT de densidad ósea en ratones falsamente operados a lo largo de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS; barras claras) o ActR11a-mFc (barras oscuras) eje y; mg/ccm).

Las Figuras 14A y 14B muestran el análisis DEXA de todo el cuerpo después de 12 semanas de tratamiento (A) y el análisis *ex vivo* de los fémures (B). Las áreas claras representan áreas de alta densidad ósea.

20 La Figura 15 muestra el análisis pQCT *ex vivo* de la diáfisis media femoral después de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control de vehículo (PBS, barras oscuras) y ActR11a-mFc (barras claras). Las cuatro barras de la izquierda muestran la densidad ósea total, mientras que las cuatro barras de la derecha muestran densidad ósea cortical. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representa datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa datos de ratones falsamente operados.

25 La Figura 16 muestra el análisis pQCT *ex vivo* y el contenido de hueso diafisario de la diáfisis media femoral después de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control de vehículo (PBS, barras oscuras) o ActR11a-mFc (barras claras). Las cuatro barras de la izquierda muestran el contenido óseo total, mientras que las cuatro barras de la derecha muestran el contenido óseo cortical. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representa datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa datos de ratones falsamente operados.

30 La Figura 17 muestra el análisis pQCT *ex vivo* de la diáfisis media femoral y el espesor femoral cortical. Los tratamientos fueron control (PBS; barras oscuras) y ActR11a-mFc (barras claras). Las cuatro barras a la izquierda muestran la circunferencia endosteal, mientras que las cuatro barras a la derecha muestran la circunferencia perióstica. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representa datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa datos de ratones falsamente operados.

35 La Figura 18 representa los resultados del testado mecánico de los fémures después de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS, barras oscuras) y ActR11a-mFc (barras claras). Las dos barras a la izquierda representan datos de ratones ovariectomizados, mientras las dos últimas barras representan datos de ratones falsamente operados.

La Figura 19 muestra los efectos de ActR11a-mFc sobre el volumen de hueso trabecular.

La Figura 20 muestra los efectos de ActR11a-mFc sobre la arquitectura trabecular en el fémur distal.

40 La Figura 21 muestra los efectos de ActR11a-mFc sobre el hueso cortical.

La Figura 22 muestra los efectos de ActR11a-mFc sobre la resistencia mecánica de hueso.

La Figura 23 muestra los efectos de diferentes dosis de ActR11a-mFc sobre las características óseas a tres dosificaciones diferentes.

45 La Figura 24 muestra la histomorfometría ósea que indica que ActR11a-mFc tiene actividad dual anabólica y anti-reabsorción.

La Figura 25 muestra datos histomorfométricos adicionales.

50 La Figura 26 muestra imágenes de fémures de ratón de ratones naíf y portadores de tumor, y los efectos del tratamiento con ActR11a-mFc sobre la morfología ósea en el modelo de mieloma múltiple. Los ratones portadores de tumores de mieloma múltiple (5T2) muestran picadura y degradación acusadas en el hueso con relación a los ratones normales (naíf). El tratamiento con ActR11a-mFc elimina este efecto.

La Figura 27 muestra los resultados de la prueba clínica humana descrita en el Ejemplo 5, en donde el área bajo la curva (AUC) y la dosis administrada de ActRIIa-hFc tienen una correlación lineal, con indiferencia de si ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC).

La Figura 28 muestra una comparación de los niveles en suero de ActRIIa-hFc en pacientes administrados IV o SC.

- 5 La Figura 29 muestra los niveles de fosfatasa alcalina ósea (BAP) en respuesta a diferentes niveles de dosis de ActRIIa-hFc. BAP es un identificador para el crecimiento anabólico óseo.

La Figura 30 muestra los efectos cooperativos de ActRIIa-mFc (RAP-011) y un agente bisfosfonato (Zoledronato) en los ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 1. Vista de conjunto

La superfamilia de factores del crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran diversidad de tipos de células tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y especificación tisular, y pueden influir en una diversidad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis, y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y la TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Por manipulación de la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, es a menudo posible causar cambios fisiológicos importantes en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado vacuno Piedmontés y Belgian Blue llevan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (llamado también miostatina) que causa un aumento acusado en la masa muscular. Grobet et al., Natl Genet. 1997, 17 (1):71-4. Adicionalmente, en humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con masa muscular incrementada y, supuestamente, resistencia excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

25 Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos dímeros que pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Existen tres formas principales de activina (A, B, y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, y $\beta_A\beta_B$). El genoma humano codifica también una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado. En la superfamilia TGF- β , las activinas son factores singulares y multifuncionales que pueden estimular la producción hormonal en las células ováricas y placentarias, soportar la supervivencia de las células neuronales, influir positiva o negativamente en el progreso del ciclo celular dependiendo del tipo de célula, e inducir diferenciación mesodérmica al menos en los embriones de anfibio (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Además, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de las células de leucemia monocítica humana estimuladas es idéntico a la activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A actúa como regulador positivo natural de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina está antagonizada por su heterodímero afín, inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) por la hipófisis, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de activina y/o fijarse a activina incluyen follistatina (FS), proteína afín a follistatina (FSRP), y α_2 -macroglobulina.

40 Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heterómeros de receptores de serina/treonina-quinasa tipo I y tipo II, que fosforilan y activan proteínas Smad aguas abajo después de estimulación de ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 1:169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembranales, compuestas de un dominio extracelular de fijación de ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembranal, y un dominio citoplásmico con especificidad predicha serina/treonina. Los receptores tipo I son esenciales para señalización; y los receptores tipo II son necesarios para la fijación de ligandos y para expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina tipo I y II forman un complejo estable después de fijación del ligando, dando como resultado la fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

50 Se han identificado dos receptores tipo II afines, ActRIIa y ActRIIb, como los receptores tipo II para las activinas (Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68:97-108). Además de las activinas, ActRIIa y ActRIIb pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF- β , con inclusión de BMP7, Nodal, GDF8, y GDF1 1 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 es el receptor primario tipo I para las activinas, particularmente para activina A, y ALK-7 puede ser asimismo como receptor para activinas, particularmente para activina B.

55 Como se demuestra en esta memoria, un polipéptido soluble ActRIIa (sActRIIa), que muestra preferencia sustancial en la fijación a activina A al contrario que otros miembros de la familia TGF-beta, tales como GDF8 o GDF11, es eficaz para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea in vivo. Si bien no se desea quedar ligados a

mecanismo particular alguno, se espera que el efecto de sActR11a esté causado principalmente por un efecto antagonista de activina, dada la muy fuerte fijación de activina (constante de disociación picomolar) exhibida por el constructo particular sActR11a utilizado en estos estudios. Cualquiera que sea el mecanismo, es evidente por los datos presentados en esta memoria que los antagonistas de ActR11a-activina aumentan realmente la densidad ósea en los ratones normales, en modelos de ratón para osteoporosis y en un modelo de mieloma múltiple de ratón. Debe indicarse que el hueso es un tejido dinámico, con crecimiento o contracción y densidad aumentada o disminuida dependiendo de un equilibrio de factores que producen hueso y estimulan la mineralización (fundamentalmente osteoblastos) y factores que destruyen y desmineralizan el hueso (fundamentalmente osteoclastos). El crecimiento y la mineralización del hueso pueden aumentarse por aumento de los factores productivos, por disminución de los factores destructivos, o por ambas causas. Los términos "promoción de crecimiento óseo" y "aumento de la mineralización ósea", se refieren a los cambios físicos observables en el hueso y deben considerarse como neutros en cuanto al mecanismo por el cual ocurren cambios en el hueso.

Los modelos de ratón para osteoporosis y crecimiento/densidad óseo(a) que se utilizaron en los estudios descritos en esta memoria están considerados como altamente predictivos de eficacia en humanos, y por consiguiente, los polipéptidos ActR11a y otros antagonistas de activina-ActR11a pueden utilizarse para promover el crecimiento óseo y el aumento de la densidad ósea en humanos. Los antagonistas de activina-ActR11a incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActR11a solubles fijadores de activina, anticuerpos que se fijan a activina (particularmente las subunidades de activina A o B, a las que se hace referencia también como βA o βB) y que rompen la fijación de ActR11a, anticuerpos que se fijan a ActR11a y rompen la fijación de activina, proteínas distintas de anticuerpos seleccionadas para fijación de activina o ActR11a (véase, v.g., WO/2002/088171, WO/2006/055689, y WO/2002/032925 para ejemplos de tales proteínas y métodos para diseño y selección de tales reactivos de fijación por afinidad distintos de anticuerpos), y péptidos aleatorizados seleccionados para fijación de activina o ActR11a, fijados a menudo a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de fijación de activina o ActR11a, especialmente fijadores de activina que bloquean los sitios de fijación tipo I (v.g., un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (v.g., un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, pueden enlazarse una a otra para crear una molécula de fijación bifuncional. Los aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización activina-ActR11a. Diversas proteínas tienen actividad antagonista de activina-ActR11a, con inclusión de inhibina (es decir, la subunidad alfa de inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente la activina en todos los tejidos, follistatina (v.g. follistatina-288 y follistatina-315). FSRP, activina C, alfa(2)-macroglobulina, y una activina-A mutante M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). Generalmente, formas alternativas de activina, particularmente aquéllas que presentan alteraciones en el dominio de fijación del receptor tipo I pueden fijarse a receptores tipo II y no consiguen formar un complejo ternario activo, actuando así como antagonistas. Adicionalmente, ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, siRNAs o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o bien, particularmente, la expresión de ActR11a, pueden utilizarse como antagonistas de activina-ActR11a. Preferiblemente, el antagonista de activina-ActR11a a utilizar exhibirá selectividad para inhibir la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11. Las proteínas ActR11a solubles se fijan de hecho a activina; sin embargo, la proteína de tipo salvaje no exhibe una selectividad importante en la fijación a activina frente a GDF8/11, y experimentos preliminares sugieren que esta proteína no proporciona los efectos deseados en el hueso, en tanto que causa también un crecimiento muscular sustancial. No obstante, han sido identificadas formas alteradas de ActR11b con propiedades de fijación diferentes (véase, v.g., WO 2006/012627, pp. 55-59, y estas proteínas pueden conseguir los efectos deseados sobre el hueso. ActR11b nativa o alterada puede adquirir especificidad añadida para activina por acoplamiento con un segundo agente de fijación selectivo para activina.

Los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en que se utiliza cada término. Ciertos términos se exponen a continuación o en otros lugares de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al experto en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y el modo de producir y utilizar los mismos.

"Alrededor de" y "aproximadamente" significarán por regla general un grado de error aceptable en cuanto a la cantidad medida, dada la naturaleza o precisión de las medidas. Típicamente, los grados de error ilustrativos están dentro de 20 por ciento (%), preferiblemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5% de un valor o gama de valores dado(a).

Alternativamente, y en particular en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en esta memoria son aproximadas a no ser que se indique otra cosa, lo que significa que el término "alrededor de" y "aproximadamente" puede deducirse cuando no se indica expresamente.

Las secuencias pueden compararse unas con otras, incluyen la secuencia de tipo salvaje para uno o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímeros, v.g., utilizando programas y/o algoritmos de alineación de secuencias que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por citar sólo unos cuantos). El técnico experto puede apreciar fácilmente

que, en tales alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o deleción de un residuo, la alineación de la secuencia introducida una "laguna" (representada típicamente por un guión, o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o delecionado.

5 "Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la interrelación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", con inclusión de proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, como se refleja por su semejanza de secuencia, sea en términos de identidad porcentual o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

10 El término "semejanza de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos que pueden compartir o no un origen evolutivo común.

Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando está modificado con un adverbio tal como "sumamente", puede referirse a semejanza de secuencia y puede estar relacionado o no con un origen evolutivo común.

15 2. Polipéptidos ActR11a

Como se utiliza en esta memoria, el término "ActR11a" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo 11a (ActR11a) de cualquier especie y variantes derivadas de tales proteínas ActR11a por mutagénesis u otra modificación. Debe entenderse que la referencia a ActR11a en esta memoria es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActR11a son generalmente proteínas transmembranales, compuestas de un dominio extracelular de fijación de ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembranal, y un dominio citoplásmico con actividad predicha de serina/treonina-quinasa.

20 El término "polipéptido ActR11a" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido existente naturalmente de un miembro de la familia ActR11a así como cualesquiera variantes del mismo (con inclusión de mutantes, fragmentos, fusiones, y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActR11a incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActR11a conocida que tenga una secuencia idéntica al menos aproximadamente en un 80% a la secuencia de un polipéptido ActR11a, y preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% de identidad o mayor. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a de la invención puede fijarse a e inhibir la función de una proteína ActR11a y/o activina. Un polipéptido ActR11a puede promover el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Ejemplos de polipéptidos ActR11a incluyen el polipéptido humano precursor de ActR11a (SEQ ID NO: 1) y los polipéptidos ActR11a humanos solubles (v.g., SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 12).

La secuencia de la proteína precursora de ActR11a humana es como sigue:

**MGAAAKLFAVFLI SCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGV
**VEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKDSP
**EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYNILLYSLVPL
**MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPSPLLGLKPLQLLE
**VKARGRFGCVWKAQLLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
**ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
**TMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGL
**ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGL
**VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPV
**RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
TEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)********************

35 El péptido de señal lleva subrayado simple; el dominio extracelular está escrito en negrita y los posibles sitios de glicosilación enlazados a N llevan doble subrayado.

La secuencia del polipéptido humano ActR11a procesado soluble (extracelular), es como sigue:

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKD-
SPEYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)**

La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" delecionada (una secuencia Δ15) es como sigue:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
 EM (SEQ ID NO:3)

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora ActR1la humana es como sigue (nucleótidos 164-1705 de la entrada en Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
 TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
 ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
 TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTG

GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
 AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAA
 CATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
 TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCAACTCAAGAC
 CCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
 GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
 CTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC
 AGTTTGCCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAACGAGG
 CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCATAT
 CAGACTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACC
 ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
 ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
 CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
 GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
 TATAAACTTCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
 TATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
 CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
 GCATAAAAAAAGAGGCCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
 TGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
 GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA
 GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTA
 GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

5

La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActR1la humano soluble (extracelular) es como sigue:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAGA
CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGG
CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTCCAG
AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID
NO: 5)

Como se describe en esta memoria, el término "polipéptido ActR11a soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActR11a. El término "polipéptido ActR11a soluble", como se utiliza en esta memoria, incluye cualquier dominio extracelular existente naturalmente de una proteína ActR11a así como cualesquiera variantes del mismo (con inclusión de mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActR11a fijador de activina es uno que retiene la aptitud para fijarse a activina, particularmente activina AA, AB o BB. Preferiblemente, un polipéptido ActR11a fijador de activina se fijará a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menor. Secuencias de aminoácidos de la proteína precursora ActR11a humana se proporcionan más adelante. El dominio extracelular de una proteína ActR11a se fija a activina y es generalmente soluble, por lo que puede designarse como un polipéptido ActR11a soluble fijador de activina. Ejemplos de polipéptidos ActR11a solubles fijadores de activina incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 12 y 13. Se hace referencia a SEQ ID NO: 7 como ActR11a-hFc, y se describe adicionalmente en los ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActR11a solubles fijadores de activina comprenden una secuencia de señal además del dominio extracelular de una proteína ActR11a, por ejemplo, la secuencia conductora de melitina de abeja (SEQ ID NO: 8), el conductor del activador del plasminógeno tisular (TPA) (SEQ ID NO: 9) o el conductor ActR11a nativo (SEQ ID NO: 10). El polipéptido ActR11a-hFc ilustrado en SEQ ID NO: 13 utiliza un conductor TPA.

Pueden obtenerse fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActR11a por cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico codificante de un polipéptido ActR11a. Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente utilizando métodos conocidos en la técnica tales como la química fMoc o t-Boc convencional de Merrifield en fase sólida. Los fragmentos pueden producirse (recombinantemente o por síntesis química) y testarse para identificar aquellos fragmentos peptídicos que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActR11a o de la señalización mediada por activina.

Variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActR11a pueden obtenerse por cribado de genotecas de polipéptidos modificados producidas recombinantemente a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido ActR11a. Las variantes pueden producirse y testarse para identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActR11a o de la señalización mediada por activina. Una variante funcional de los polipéptidos ActR11a puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 75% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2 ó 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2 ó 3.

Pueden generarse variantes funcionales por modificación de la estructura de un polipéptido ActR11a para propósitos tales como mejora de la eficacia terapéutica, o estabilidad (v.g., vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Tales polipéptidos ActR11a modificados, cuando se seleccionan para retener la fijación de activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActR11a existentes naturalmente. Los polipéptidos ActR11a modificados pueden producirse también, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazamiento aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazamiento similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente afín (v.g. mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Reemplazamientos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que son afines en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActR11a da como resultado un homólogo funcional puede ser determinado fácilmente por evaluación de la capacidad del polipéptido ActR11a variante para producir una respuesta en células de manera similar al polipéptido ActR11a de tipo salvaje.

Pueden incluirse mutaciones específicas en los polipéptidos ActR11a a fin de alterar la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones pueden seleccionarse a fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación **enlazados a O** o enlazados a N. Los sitios de reconocimiento de la glicosilación enlazados a asparagina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (o asparaginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por enzimas de glicosilación celular

apropiadas. La alteración puede hacerse también por la adición de, o sustitución por, uno o más residuos serina o treonina, en la secuencia del polipéptido ActRIIa de tipo salvaje (para sitios de glicosilación enlazados a O). Una diversidad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones del primer o tercer aminoácido de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o deleción de aminoácido en la segunda posición) da como resultado la ausencia de glicosilación en la secuencia del tripéptido modificada. Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en un polipéptido ActRIIa es por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos en el polipéptido ActRIIa. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares pueden fijarse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los fenilalanina, tirosina, o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La eliminación de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIa puede realizarse por vía química y/o por vía enzimática. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, descripción del polipéptido ActRIIa al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares excepto el azúcar enlazador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando en cambio intacta la secuencia de aminoácidos. La desglicosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos carbohidrato en los polipéptidos ActRIIa puede lograrse por el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas como ha sido descrito por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIa puede ajustarse, en caso apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, dado que las células de mamífero, levadura, insecto y planta pueden introducir todas ellas patrones de glicosilación diferentes, que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIa para uso en humanos se expresarán en una línea de células de mamífero que proporciona glicosilación apropiada, tales como líneas de células HEK293 o CHO, aunque se espera que sean útiles también otras líneas de células de expresión de mamífero, líneas de células de levadura con enzimas de glicosilación modificadas por ingeniería genética, y células de insecto.

Se describe en esta memoria un método de generación de mutantes, particularmente series de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIa, así como mutantes de truncación; las agrupaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificación de secuencias funcionales de variantes. El propósito del cribado de tales genotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIa que pueden actuar como agonistas o antagonistas, o alternativamente, que posean nuevas actividades todas juntas. Se proporcionan más adelante una diversidad de ensayos de cribado, y dichos ensayos pueden utilizarse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRIIa puede cribarse respecto a capacidad para fijarse a un ligando ActRIIa, para impedir la fijación de un ligando ActRIIa a un polipéptido ActRIIa o para interferir con la señalización causada por un ligando ActRIIa.

La actividad de un polipéptido ActRIIa o sus variantes puede testarse también en un ensayo basado en células o in vivo. Por ejemplo, puede evaluarse el efecto de una variante de polipéptido ActRIIa sobre la expresión de genes implicados en la producción de hueso o la destrucción ósea. Esto puede realizarse, en caso necesario, en presencia de una o más proteínas ligando recombinantes ActRIIa (v.g., activina), y las células pueden transfectarse a fin de producir un polipéptido ActRIIa y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando ActRIIa. Análogamente, puede administrarse un polipéptido ActRIIa a un ratón u otro animal, y pueden evaluarse una o más propiedades óseas, tales como densidad o volumen. Puede evaluarse también la velocidad de curación para las fracturas óseas. La absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) es una técnica bien establecida, no invasiva y cuantitativa para evaluación de la densidad ósea en un animal. En los humanos, pueden utilizarse sistemas DEXA centrales para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores indicadores de la densidad ósea global. Pueden utilizarse sistemas DEXA periféricos para evaluar la densidad ósea en huesos periféricos, con inclusión, por ejemplo, de los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Pueden utilizarse sistemas de imagen tradicionales por rayos X, con inclusión de escaneos CAT, para evaluar el crecimiento óseo y la curación de las fracturas. Puede evaluarse también la resistencia mecánica del hueso.

Pueden generarse variantes derivadas por medios combinatorios que tienen una potencia selectiva o generalmente incrementada con relación a un polipéptido ActRIIa existente naturalmente. Análogamente, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares espectacularmente diferentes que el polipéptido ActRIIa correspondiente de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que dan como resultado la destrucción de, o la desactivación de cualquier otro modo de un polipéptido ActRIIa nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles polipeptídicos de ActRIIa por modulación de la semivida de los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRIIa recombinante en el paciente. De una proteína de fusión Fc, pueden hacerse mutaciones en el enlazador (si existe) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Puede producirse una genoteca combinatoria por la vía de una genoteca degenerada de genes que codifican una genoteca de polipéptidos, cada uno de los cuales incluye al menos una porción de secuencias polipeptídicas ActRIIa potenciales. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente a secuencias

génicas de tal modo que el conjunto degenerado de secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIa puede expresarse como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (v.g., para presentación de fago).

5 Existen muchas vías por las cuales la genoteca de homólogos potenciales puede generarse a partir de una secuencia de nucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de DNA, y los genes sintéticos pueden ligarse luego a un vector apropiado para su expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., 10 (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Tales técnicas han sido empleadas en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; y en las Patentes U.S. Nos. 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

15 Alternativamente, pueden utilizarse otras formas de mutagénesis para generar una genoteca combinatoria. Por ejemplo, pueden generarse variantes del polipéptido ActRIIa y aislarse de una genoteca por cribado utilizando, por ejemplo, mutagénesis de escaneo de alanina y medios análogos (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; y Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), por mutagénesis de escaneo de 20 de enlazadores (Gustin et al., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) *Science* 232:316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); por mutagénesis PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o por mutagénesis aleatoria, con inclusión de mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSH L Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). La mutagénesis de escaneo de enlazadores, 25 particularmente en un escenario combinatorio, es un método atractivo para identificación de formas trincadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIa.

Se conocen en la técnica una extensa gama de métodos para cribado de productos génicos de genotecas combinatorias producidas por mutaciones puntuales y truncaciones y, en realidad, para cribado de genotecas de cDNA respecto a productos génicos que tengan cierta propiedad. Dichos métodos serán generalmente adaptables 30 para cribado rápido de las genotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIa. Las técnicas más ampliamente utilizadas para cribado de grandes bibliotecas de genes comprenden típicamente someter a clonación la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente sencillo del vector codificante del gen cuyo producto se 35 detectó. Ensayos preferidos incluyen ensayos de fijación de activina y el ensayo de señalización de células mediado por activina.

Los polipéptidos ActRIIa de la invención pueden comprender adicionalmente modificaciones posteriores a la traducción además de cualesquiera que están presentes naturalmente en los polipéptidos ActRIIa. Dichas 40 modificaciones incluyen, pero sin carácter limitante, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIa modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o mono-sacáridos, y fosfatos. Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIa pueden testarse como se describe en esta memoria para otras variantes del polipéptido ActRIIa. Cuando se produce un polipéptido ActRIIa en células por 45 escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIa, el procesamiento posterior a la traducción puede ser también importante para el plegamiento y/o la función correctos de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3, o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades posteriores a la traducción, y pueden seleccionarse a fin de asegurar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIa.

Variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIa pueden incluir proteínas de fusión que 50 tengan al menos una porción de los polipéptidos ActRIIa y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero sin carácter limitante, polihistidina, Glu-Glu, glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de fijación de maltosa (MBP), o seroalbúmina humana. Un dominio de fusión puede seleccionarse a fin de conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para aislamiento de las 55 proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para el propósito de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (**HIS₆**). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión a fin de facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIa. Ejemplos de tales 60 dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (v.g., GFP) así como "marcadores epitópicos", que son usualmente secuencias peptídicas cortas para las cuales está disponible un anticuerpo específico.

Marcadores epitópicos bien conocidos para los cuales están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, la hemaglutinina del virus de la gripe (HA), y marcadores c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el Factor Xa o Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y libere con ello las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse luego del dominio de fusión por separación cromatográfica subsiguiente. Un polipéptido ActRIIa puede fusionarse con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIa in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida en suero, con indiferencia de si ello es debido a disminución de la destrucción, disminución del aclaramiento por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Análogamente, las fusiones a seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios de multimerización (v.g. dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento óseo o el crecimiento muscular, según se desee).

Como ejemplo específico, una proteína de fusión puede comprender un dominio soluble extracelular de ActRIIa fusionado a un dominio Fc (v.g., SEQ ID NO: 6):

```
HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHEDPEVKENWYVDG      EVHNAK-TKP-
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPPIEKTKAK      GQPREPQVYTLP-
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG      PFFFLYSKLTVDKSRWQQ-
VFSCSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*
```

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322, y Asn-434. En ciertos casos, el dominio mutante Fc que tiene uno o más de estas mutaciones (v.g., la mutación Asp-265) tiene actividad reducida de fijación al receptor Fcγ con relación a un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio mutante Fc que tiene una o más de estas mutaciones (v.g., la mutación Asn-434) tiene aptitud incrementada de fijación al receptor Fc afín al MHC clase I (FcγRn) con relación a un dominio Fc de tipo salvaje.

Debe entenderse que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden estar dispuestos de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa puede situarse en posición C-terminal respecto a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede situarse en posición C-terminal respecto a un polipéptido ActRIIa. El dominio del polipéptido ActRIIa y el dominio heterólogo no precisan ser adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios adicionales o secuencias de aminoácidos en posición C- o N-terminal respecto a cada dominio o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida in vitro de los polipéptidos ActRIIa, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIa o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIa. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero sin carácter limitante: proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIa y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluyen, por ejemplo, adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIa), y modificaciones de restos carbohidrato (que incluyen, por ejemplo, eliminación de restos carbohidrato de un polipéptido ActRIIa). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIa está fusionado a un dominio estabilizador tal como una molécula IgG (v.g., un dominio FC). Como se utiliza en esta memoria, el término "dominio estabilizador" se refiere no sólo a un dominio de fusión (v.g., Fc) como en el caso de la proteína de fusión, sino que incluye también modificaciones no proteináceas tales como un resto carbohidrato, o polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol.

Formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIa, pueden aislarse de, o liberarse sustancialmente de otro modo, de otras proteínas. Los polipéptidos ActRIIa se producirán generalmente por expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos Nucleicos que Codifican Polipéptidos ActRIIa (no es parte de la invención)

Se describen en esta memoria ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa solubles), con inclusión de fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en esta memoria. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIa humano existente naturalmente, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de DNA o RNA. Estos ácidos nucleicos pueden utilizarse, por ejemplo, en métodos para fabricación de polipéptidos ActRIIa o como agentes terapéuticos directos (v.g., en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende adicionalmente que los ácidos nucleicos objetivo que codifican polipéptidos ActRIIa incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 4 ó 5. Secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

Se describen también en esta memoria secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son idénticas al menos en un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a SEQ ID NO: 4 ó 5. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que pueden proporcionarse secuencias de ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO: 4 ó 5, y variantes de SEQ ID NO: 4 ó 5. Las secuencias de ácido nucleico descritas en esta memoria pueden ser aisladas, recombinantes, y/o estar fusionadas con una secuencia de nucleótido heteróloga, o en una biblioteca de DNA.

Los ácidos nucleicos pueden incluir también secuencias nucleotídicas que se hibridan en condiciones de alta severidad a la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 4 ó 5, secuencia de complemento de SEQ ID NO: 4 ó 5, o fragmentos de la misma. Como se ha expuesto anteriormente, una persona con experiencia ordinaria en la técnica comprenderá fácilmente que las condiciones de severidad apropiadas que promueven la hibridación de DNA pueden variarse. Por ejemplo, podría realizarse la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida por un lavado de 2,0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado puede seleccionarse desde una severidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C a una severidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Adicionalmente, la temperatura en el paso de lavado puede aumentarse desde condiciones de severidad baja a la temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de severidad alta a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras que la otra variable se modifica. En esta memoria se describen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de severidad baja de 6 x SSC a la temperatura ambiente seguido por un lavado a 2 x SSC a la temperatura ambiente.

Ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos expuestos en SEQ ID NOs: 4 ó 5 debido a la degeneración del código genético se describen también en esta memoria. Por ejemplo, cierto número de aminoácidos son designados por más de un triplete. Codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de secuencia de DNA que conducen de hecho a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión existan entre células de mamífero. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a variación alélica natural.

Los ácidos nucleicos recombinantes descritos en esta memoria pueden estar enlazados operativamente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias nucleotídicas reguladoras serán apropiadas generalmente para la célula hospedadora utilizada para expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas se conocen en la técnica para una diversidad de células hospedadoras. Típicamente, dichas una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, pero sin carácter limitante, secuencias promotoras, secuencias conductoras o de señal, sitios de fijación de ribosoma, secuencias de comienzo y terminación de la transcripción, secuencias de comienzo y terminación de la traducción, y secuencias intensificadoras o activadoras. Se contemplan promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica.

Los promotores pueden ser promotores existentes naturalmente, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula o en un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión puede estar insertado en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora utilizada.

El ácido nucleico puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIa y enlazado operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIa. De acuerdo con ello, el término secuencia reguladora incluye promotores, intensificadores, y otros elementos de control de la expresión. Secuencias reguladoras ilustrativas se describen en Goeddel: Gen Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Ca (1990). Por ejemplo, cualquiera de una gran diversidad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de DNA cuando están enlazadas operativamente a ella pueden utilizarse en estos vectores para expresar secuencias de DNA que codifican un polipéptido ActRIIa. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores precoz y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor precoz inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la RNA-polimerasa T7, las regiones operadora y promotora principales del fago lambda, las regiones de control para la proteína fd de la cubierta, el promotor para 3-fosfoglicerato-quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, v.g., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento a de levadura, el promotor poliédrico del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas para control de la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, deberían considerarse también el número de copias del vector, la

capacidad para controlar dicho número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante puede producirse por ligación del gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero), o ambas. Vehículos de expresión para producción de un polipéptido ActRIIa recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, 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 expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamífero contienen a la vez 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 mamífero adecuados para transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, a fin de facilitar la replicación y selección de resistencia a los fármacos en células tanto procariotas como eucariotas. Alternativamente, derivados de virus tales como el virus del papiloma de los bovinos (BPV-1), o el virus Epstein-Barr (pHBEo, derivado de pREP y p205) pueden utilizarse para expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (con inclusión de sistemas retrovirales) pueden encontrarse más adelante en la descripción de los sistemas de suministro de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en transformación de organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como para células eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algún caso, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes por el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBacIII que contiene β-gal).

Un vector puede diseñarse para producción de los polipéptidos ActRIIa objetivo en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como resultará evidente, los constructos génicos objetivo pueden utilizarse para causar la expresión de los polipéptidos ActRIIa objetivo en células propagadas en cultivo, v.g., para producir proteínas, con inclusión de proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

Se describe también una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (v.g., SEQ ID NO: 4 ó 5) para uno o más de los polipéptidos ActRIIa objetivo. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (v.g., utilizando un sistema de expresión de baculovirus), levadura, o células de mamífero. Otras células hospedadoras adecuadas con conocidas por los expertos en la técnica.

Se describen en esta memoria métodos de producción de los polipéptidos ActRIIa objetivo. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIa puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que tenga lugar la expresión del polipéptido ActRIIa. El polipéptido ActRIIa puede secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y un medio que contenga el polipéptido ActRIIa. Alternativamente, el polipéptido ActRIIa puede retenerse citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células cosecharse, lisarse y aislarse la proteína. Un cultivo de células incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Medios adecuados para cultivo de células son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActRIIa objetivo pueden aislarse de un medio de cultivo de células, células hospedadoras, o ambos, utilizando métodos conocidos en la técnica para purificación de proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos para epítopes particulares de los polipéptidos ActRIIa y purificación por afinidad con un agente que se fija a un dominio fusionado al polipéptido ActRIIa (v.g., puede utilizarse una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIa-Fc). El polipéptido ActRIIa puede ser una proteína de fusión que contenga un dominio que facilite su purificación. La purificación puede realizarse por una serie de pasos de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de sefarosa Q, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión de tamaños, y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación puede completarse con filtración viral e intercambio de tampón. Como se demuestra en esta memoria, la proteína ActRIIa-hFc se purificó hasta una pureza > 98% como se determinó por cromatografía de exclusión de tamaños y > 95% como se determinó por SDS PAGE. Este nivel de pureza era suficiente para conseguir efectos deseables en los huesos en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

Un gen de fusión que codifica una secuencia conductora de purificación, tal como una secuencia del sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el término N de la porción deseada del polipéptido ActRIIa recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad utilizando una resina metálica Ni²⁺. La secuencia conductora de purificación puede eliminarse a continuación posteriormente por

tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIa purificado (v.g., véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

5 Las técnicas para producción de genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de DNA que codifican diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando términos de extremos romos o extremos cohesivos para ligación, digestión con enzimas de restricción a fin de proporcionar los términos apropiados, relleno de extremos cohesivos en caso apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina a fin de evitar uniones indeseables, y ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de DNA automáticos. Alternativamente, la
10 amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a colgantes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden reasociarse subsiguientemente para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, editores Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Antagonistas Alternativos de Activina y ActRIIa (no es parte de la invención)

15 Los datos presentados en esta memoria demuestran que pueden utilizarse antagonistas de la señalización de Activina-ActRIIa para promover el crecimiento óseo y la mineralización del hueso. Aunque se describe en esta memoria ciertos polipéptidos ActRIIa solubles, y particularmente ActRIIa-Fc, y aunque tales antagonistas pueden afectar al hueso por un mecanismo distinto del antagonismo de activina (v.g., la inhibición de activina puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de moléculas, que incluyen, quizás, otros miembros de la superfamilia TGF-beta, y dicha inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado en el
20 hueso), se espera que otros tipos de antagonistas de Activina-ActRIIa sean útiles, con inclusión de anticuerpos anti-activina (v.g., A, B, C o E), anticuerpos anti-ActRIIa, ácidos nucleicos antisentido, RNAi o de ribozima que inhiben la producción de ActRIIa y otros inhibidores de activina o ActRIIa, particularmente aquéllos que rompen la fijación Activina-ActRIIa.

25 Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIa (v.g. un polipéptido ActRIIa soluble) que se fija competitivamente al ligando con el polipéptido ActRIIa o inhibe de otro modo la señalización mediada por ActRIIa puede utilizarse como antagonista de las actividades de los polipéptidos ActRIIa. Análogamente, un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido A de activina y que rompe la fijación de ActRIIa puede utilizarse como antagonista.

30 Por la utilización de inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIa o un polipéptido de activina, pueden producirse antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales por protocolos estándar (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, editado por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo puede ser inmunizado con una forma inmunógena del polipéptido ActRIIa, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación a vehículos u otros
35 métodos bien conocidos en la técnica. Una porción inmunógena de un polipéptido ActRIIa o activina puede administrarse en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede monitorizarse por detección de los títulos de anticuerpos en plasma o suero. Pueden utilizarse ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

40 Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIa, pueden obtenerse antisueros y, en caso deseado, pueden aislarse anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, pueden cosecharse células productoras de anticuerpos (linfocitos) a partir de un animal inmunizado y fusionarse por procedimientos de fusión estándar de células somáticas con células inmortalizadoras tales como células de mieloma a fin de producir células de hibridoma. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975),
45 Nature, 256: 495-497), la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4:72), y la técnica del hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células de hibridoma pueden cribarse inmunoquímicamente para producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIa y aislarse anticuerpos monoclonales de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

50 El término "anticuerpo", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto incluir fragmentos del mismo que son también específicamente reactivos con uno de los presentes polipéptidos. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos pueden cribarse en cuanto a utilidad de la misma manera que se ha descrito arriba para anticuerpos enteros. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab)₂ por tratamiento de un anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro a fin de
55 producir un fragmento Fab. Los anticuerpos dados a conocer en esta memoria están pensados para incluir adicionalmente moléculas biespecíficas, monocatenarias, quiméricas, humanizadas y totalmente humanas que tienen afinidad para un polipéptido ActRIIa o activina conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede comprender además un identificador unido al mismo y susceptible de ser detectado (v.g., el identificador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante, término que abarca cualquier anticuerpo generado en parte por técnicas de biología molecular, con inclusión de anticuerpos injertados en CDR o quiméricos, anticuerpos humanos o de otra clase ensamblados a partir de dominios de anticuerpos seleccionados de genotecas, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos de un solo dominio (v.g., proteínas humanas V_H o proteínas V_{HH} de camélido). El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, describiéndose en esta memoria métodos para generación de nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generación de un anticuerpo monoclonal que se fija específicamente a un polipéptido ActRIIa o polipéptido de activina puede comprender la administración a un ratón de una cantidad de una composición inmunógena que comprende el polipéptido antigénico eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpos (v.g., células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma a fin de obtener hibridomas productores de anticuerpos, y testar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se fije específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo de células, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células derivadas del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se fija específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo celular.

El adjetivo "específicamente reactivo con", cuando se utiliza con referencia a un anticuerpo, tiene la finalidad de significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (v.g.; un polipéptido ActRIIa) y otros antígenos que no son de interés para los cuales es útil el anticuerpo, detectando como mínimo la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un grado mayor de especificidad de fijación. Los anticuerpos monoclonales tienen generalmente una mayor tendencia (comparados con los anticuerpos policlonales) a discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos que reaccionan de manera cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Aunque la especificidad deseada puede alcanzarse con una gama de afinidades diferentes, generalmente los anticuerpos preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menor. Dada la unión extraordinariamente fuerte entre activina y ActRIIa, se espera que un anticuerpo anti-activina o anti-ActRIIa neutralizante tenga generalmente una constante de disociación de 10^{-10} o menos.

Adicionalmente, las técnicas utilizadas para el cribado de anticuerpos a fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo debe utilizarse para fijación de un antígeno en solución, puede ser deseable testar la fijación en solución. Se dispone de una diversidad de técnicas diferentes para el testado de la interacción entre los anticuerpos y los antígenos a fin de identificar anticuerpos particularmente deseables. Técnicas de este tipo incluyen ELISAs, ensayos de fijación de resonancia de plasmones de superficie (v.g., el ensayo de fijación Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos sándwich (v.g., el sistema de cuentas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación, e inmunohistoquímica.

Ejemplos de categorías de compuestos de ácido nucleico que son antagonistas de activina o ActRIIa incluyen ácidos nucleicos antisentido, constructos de RNAi y constructos de ácidos nucleicos catalíticos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto bicatenario puede incluir también regiones colgantes o de no-complementariedad, en donde una u otra de las cadenas es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, lo que significa que el compuesto forma una estructura denominada de "horquilla" o de "tallo y bucle", con una región de estructura de doble hélice. Un compuesto de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región constituida por no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 20, 25, 22, 20 ó 18 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico ActRIIa de longitud total o de la secuencia de ácido nucleico de activina βA o βB . La región de complementariedad tendrá preferiblemente al menos 8 nucleótidos, y opcionalmente al menos 10 o al menos 15 nucleótidos, y opcionalmente entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede caer dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no codificante del transcrito diana, tal como la porción de la secuencia codificante. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y opcionalmente la longitud será aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un DNA particularmente para uso como antisentido), RNA o híbrido RNA:DNA. Una cadena cualquiera puede incluir una mezcla de DNA y RNA, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como DNA o RNA. Análogamente, un compuesto bicatenario puede ser DNA:DNA, DNA:RNA o RNA:RNA, y una cadena cualquiera puede incluir también una mezcla de DNA y RNA, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como DNA o RNA. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una diversidad de modificaciones, que incluyen una o más modificaciones en la cadena principal (la porción azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, con inclusión de enlaces internucleotídicos) o la porción de base (la porción de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico antisentido tendrá preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y contendrá a menudo una o más modificaciones para mejorar características tales como estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar en el que el compuesto es probable que se suministre, tal como el estómago en el caso de compuestos suministrados por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de un constructo de RNAi, la cadena complementaria al transcrito diana será generalmente RNA o

modificaciones del mismo. La otra cadena puede ser RNA, DNA o cualquier otra variación. La porción dúplex del constructo RNAi bicatenario o monocatenario "en horquilla" tendrá preferiblemente una longitud de 18 a 40 nucleótidos y tendrá de modo opcional aproximadamente 21 a 23 nucleótidos, con tal que la misma sirva como un sustrato Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de DNA y pueden contener también formas modificadas. Los compuestos de ácido nucleico pueden inhibir la expresión de la diana aproximadamente en un 50%, 75%, 90% o más cuando están en contacto con las células en condiciones fisiológicas y a una concentración en la que un control sin sentido o control de sentido tiene poco o ningún efecto. Concentraciones preferidas para testar el efecto de los compuestos de ácido nucleico son 1,5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácido nucleico pueden testarse también en cuanto a efectos sobre, por ejemplo, el crecimiento y la mineralización óseos.

5. Ensayos de Cribado (no son parte de la invención)

Los polipéptidos ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa solubles) y polipéptidos de activina pueden utilizarse para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas del camino de señalización Activina-ActRIIa. Los compuestos identificados por este cribado pueden testarse a fin de evaluar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización de los huesos in vitro. Opcionalmente, estos compuestos pueden testarse además en modelos animales no humanos a fin de evaluar su capacidad para modular el crecimiento tisular in vivo.

Existen numerosos métodos para cribado en cuanto a agentes terapéuticos para modulación del crecimiento tisular por direccionamiento de los polipéptidos activina y ActRIIa. El cribado de alta capacidad de compuestos puede realizarse para identificar agentes que perturban los efectos mediados por activina o ActRIIa en el hueso. En ciertos casos, el ensayo se realiza para cribar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la fijación de un polipéptido ActRIIa a activina. Alternativamente, el ensayo puede utilizarse para identificar compuestos que mejoran la fijación de un polipéptido ActRIIa a activina. Los compuestos pueden identificarse por su capacidad para interactuar con un polipéptido de activina o ActRIIa.

Serán suficientes una diversidad de formatos de ensayo y, a la vista de la presente descripción, los no descritos expresamente en esta memoria serán comprendidos sin embargo por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Como se describe en esta memoria, los compuestos de test (agentes) pueden ser creados por cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los presentes compuestos pueden ser biomoléculas existentes naturalmente, sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) a testar en cuanto a su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (v.g., productos naturales), producirse químicamente (v.g., moléculas pequeñas, con inclusión de peptidomiméticos), o producirse por recombinación. Los compuestos de test incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas, y moléculas de ácido nucleico. En un caso específico, el agente de test es una pequeña molécula orgánica que tiene un peso molecular menor que aproximadamente 2000 Daltons.

Los compuestos de test pueden proporcionarse como entidades individuales discretas, o proporcionarse en genotecas de mayor complejidad, tales como las producidas por química combinatoria. Estas genotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de test al sistema de test puede hacerse en forma aislada o como mixturas de compuestos, especialmente en los pasos de cribado iniciales. Como una opción, los compuestos pueden derivatizarse facultativamente con otros compuestos y tienen grupos derivatizantes que facilitan el aislamiento de los compuestos. Ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, cuentas magnéticas, glutatión-S-transferasa (GST), reticuladores fotoactivables o cualesquiera combinaciones de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos que testan genotecas de compuestos y extractos natales, son deseables ensayos de alta capacidad a fin de maximizar el número de compuestos examinados en un periodo de tiempo dado. Ensayos que se realizan en sistemas exentos de células, tales como los que pueden estar basados en proteínas purificadas o semi-purificadas, se prefieren a menudo como filtros "primarios" en el sentido de que los mismos pueden generarse para permitir desarrollo rápido y detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de test. Además, los efectos de toxicidad o biodisponibilidad celular del compuesto de test pueden ser ignorados generalmente en el sistema in vitro, estando enfocado el ensayo en lugar de ello fundamentalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular tal como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de fijación entre un polipéptido ActRIIa y activina.

Simplemente a modo de ejemplo, en un ensayo ilustrativo de cribado el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIa aislado y purificado que es ordinariamente capaz de fijarse a activina. A la mixtura del compuesto y el polipéptido ActRIIa se añade luego una composición que contiene un ligando de ActRIIa. La detección y cuantificación de los complejos ActRIIa/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIa y activina. La eficacia del compuesto puede evaluarse por generación de curvas dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de test. Además, puede realizarse también un ensayo de control para proporcionar una línea base para comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y

purificada a una composición que contiene el polipéptido ActR11a, y se cuantifica la formación del complejo ActR11a/activina en ausencia del compuesto de test. Se comprenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar las sustancias puede modificarse, pudiendo mezclarse éstas simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden utilizarse extractos y lisados celulares a fin de producir un sistema de ensayo adecuado exento de células.

La formación de complejos entre el polipéptido ActR11a y activina puede ser detectada por una diversidad de técnicas. Como ilustración, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas detectablemente tales como polipéptido R11a o activina radiomarcados (v.g., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcados por fluorescencia (v.g., FITC), o marcados enzimáticamente, por inmunoensayo, o por detección cromatográfica.

Pueden utilizarse ensayos de polarización por fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, directa o indirecta, del grado de interacción entre un polipéptido ActR11a y su proteína de fijación. Adicionalmente, pueden utilizarse otros modos de detección, tales como los basados en guías ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente U.S. No. 5.677.196), resonancia de plasmones de superficie (SPR), sensores de carga de superficie, y sensores de resistencia de superficie.

Un ensayo de trampa de interacción, conocido también como "ensayo de dos híbridos", puede utilizarse para identificar agentes que rompen o potencian la interacción entre un polipéptido ActR11a y su proteína de fijación. Véase, por ejemplo, la patente U.S. No. 5.283.317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; e Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). Pueden utilizarse sistemas inversos de dos híbridos para identificar compuestos (v.g., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActR11a para identificar compuestos (v.g., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActR11a y su proteína de fijación. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; y las Patentes U.S. Nos. 5.525.490; 5.955.280, y 5.965.368.

Los presentes compuestos pueden identificarse por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActR11a o activina descrito en esta memoria. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActR11a o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse al nivel proteínico utilizando métodos bioquímicos in vitro, con inclusión de foto-reticulación, fijación de ligandos radiomarcados, y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46:1). En ciertos casos, los compuestos pueden cribarse en un ensayo basado en mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se fijan a un polipéptido de activina o ActR11a. Éste puede incluir un suceso de fijación en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido de activina o ActR11a puede transfectarse con un sistema informador (v.g., β -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) a una célula y cribarse contra la genoteca preferiblemente por un cribado de alta capacidad o con miembros individuales de la genoteca. Pueden utilizarse otros ensayos de fijación basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de fijación que detectan cambios en energía libre. Los ensayos de fijación pueden realizarse con la diana fijada a un pocillo, una cuenta o un chip o ser capturados por un anticuerpo inmovilizado o resueltos por electroforesis capilar. Los compuestos fijados pueden detectarse usualmente utilizando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmones de superficie.

Se describen en esta memoria métodos y agentes para modular (por estimulación o inhibición) la formación de hueso y aumentar la masa ósea. Por esta razón, cualquier compuesto identificado puede testarse en células enteras o tejidos, in vitro o in vivo, a fin de confirmar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización del hueso. Para este propósito pueden utilizarse diversos métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActR11a o activina o compuestos de test sobre el crecimiento óseo o cartilaginoso puede determinarse por medida de la inducción de Mx2 o diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos basados en células (véase, v.g., Daluiski et al., *Nat Genet.* 2001, 27 (1): 84-8; Hino et al., *Front Biosci.* 2004, 9:1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye el análisis de la actividad osteogénica de los presentes polipéptidos ActR11a o activina y compuestos de test en células progenitoras mesenquimáticas y osteoblásticas. Como ilustración, pueden construirse adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido activina o ActR11a para infectar células progenitoras pluripotenciales mesenquimáticas C3H10Y1/2, células preosteoblásticas CD2C12, y células osteoblásticas TE-85. La actividad osteogénica se determina luego por medida de la inducción de fosfatasa alcalina, osteocalcina, y mineralización de la matriz (véase, v.g., Cheng et al., *J Bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A (8): 1544-52).

Pueden utilizarse ensayos in vivo para medir el crecimiento óseo o cartilaginoso. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., *Bone*, 28:80-86 (2001) dan a conocer un modelo osteoporótico de rata en el cual se estudia la reparación ósea durante el periodo temprano después de una fractura. Kubo et al., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68:197-202 (1999) describen también un modelo osteoporótico de rata en el cual se estudia la reparación ósea durante el periodo final después de una fractura.

Andersson et al., *J. Endocrinol.* 170: 529-537 describen un modelo de osteoporosis en ratones en el cual los ratones se someten a ovariectomía, lo que hace que los ratones pierdan contenido mineral óseo y densidad mineral ósea

substanciales, perdiendo el hueso trabecular aproximadamente el 50% de la densidad mineral ósea. La densidad ósea podía aumentarse en los ratones ovariectomizados por administración de factores tales como hormona paratiroidea. Pueden utilizarse ensayos de curación de fracturas que se conocen en la técnica. Estos ensayos incluyen técnica de fractura, análisis histológico, y análisis bioquímico, que se describen, por ejemplo, en la patente U.S. No. 6.521.750, que describe protocolos experimentales para causar y medir la extensión de las fracturas, y el proceso de reparación.

6. Usos Terapéuticos Ilustrativos

Los antagonistas activina-ActR11a (v.g., polipéptidos ActR11a) pueden utilizarse para tratamiento o prevención de una enfermedad o afección que está asociada con el deterioro óseo, sea, v.g., por rotura, pérdida o desmineralización. Como se demuestra en esta memoria, los antagonistas de activina-ActR11a, y particularmente los constructos ActR11a-Fc, son eficaces en el tratamiento o la prevención de la pérdida ósea relacionada con el cáncer. Se describen en esta memoria métodos de tratamiento o prevención del deterioro óseo en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, por administración al individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de activina-ActR11a, particularmente un polipéptido ActR11a. Se describen también métodos de promoción del crecimiento o la mineralización de los huesos en un individuo que se encuentra en necesidad de ello por administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de activina-ActR11a, particularmente un polipéptido ActR11a. Estos métodos están orientados preferentemente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más preferiblemente humanos. Se describen en ellos antagonistas de activina-ActR11a (particularmente polipéptidos ActR11a solubles y anticuerpos neutralizantes direccionados a activina o ActR11a) para el tratamiento de trastornos asociados con densidad ósea baja o resistencia ósea reducida.

Como se utiliza en esta memoria, un producto terapéutico que "previene" un trastorno o afección hace referencia a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada con relación a una muestra de control sin tratar, o retarda la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con relación a la muestra de control sin tratar. El término "tratamiento", como se utiliza en esta memoria, incluye profilaxis de la afección considerada o mejora o eliminación de la afección una vez que se ha diagnosticado la misma. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento pueden discernirse en el diagnóstico proporcionado por un médico y el resultado propuesto de administración del agente terapéutico.

La descripción describe métodos de inducción de la formación de hueso y/o cartílago, prevención de la pérdida ósea, aumento de la mineralización de los huesos o prevención de la desmineralización ósea. Por ejemplo, los presentes antagonistas de activina-ActR11a tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y la curación de fracturas óseas y defectos de cartílago en humanos y otros animales. Los polipéptidos ActR11a o activina pueden ser útiles en pacientes que han sido diagnosticados de densidad ósea subclínica baja, como medida protectora contra el desarrollo de osteoporosis.

Las presentes composiciones pueden encontrar utilidad médica en la curación de fracturas óseas y defectos de cartílago en humanos y otros animales. Las presentes composiciones pueden tener también uso profiláctico en la reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas y en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de hueso *de novo* inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismos, o inducidos por resección oncológica, y es también útil en cirugía plástica cosmética. En ciertos casos, los presentes antagonistas de activina-ActR11a pueden proporcionar un ambiente para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Los antagonistas de activina-ActR11a pueden ser útiles también en el tratamiento de la osteoporosis.

Las composiciones de la invención pueden aplicarse a afecciones caracterizadas por o que incluyen pérdida ósea, tales como osteoporosis, (con inclusión de osteoporosis secundaria), hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, enfermedad de Paget, tirotoxicosis, estado diarreico o malabsorción crónica, acidosis tubular renal, o anorexia nervosa.

La osteoporosis puede estar causada por, o asociada con, diversos factores. Ser mujer, particularmente una mujer post-menopáusica, que tiene un peso corporal bajo, y que lleva un estilo de vida sedentario, son todos ellos factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea, que conduce a riesgo de fracturas). Las personas que presentan cualquiera de los perfiles siguientes pueden ser candidatos para tratamiento con un antagonista de ActR11a: una mujer post-menopáusica y que no toma estrógenos u otra terapia de reemplazamiento hormonal; una persona con una historia personal o materna de fractura de cadera o fumadora; una mujer post-menopáusica que es alta (talla superior a 5 pies y 7 pulgadas (1,70 m) o delgada (menos de 125 libras (56,7 kg)); un hombre con afecciones clínicas asociadas con pérdida ósea; una persona que utilice medicamentos que se sabe causan pérdida ósea, con inclusión de corticosteroides tales como Prednisona™, diversas medicaciones antiepilépticas tales como Dilantin™ y ciertos barbituratos, o fármacos de reemplazamiento tiroideo a dosis altas; una persona que padece Diabetes tipo 1, enfermedad hepática, enfermedad renal o historia familiar de osteoporosis; una persona que padezca renovación ósea alta (v.g., colágeno excesivo en muestras de orina); una persona con una afección tiroidea, tal como hipertiroidismo; una persona que ha experimentado una fractura después de un traumatismo sólo

moderado; una persona que ha presentado evidencia por rayos X de fractura vertebral u otros signos de osteoporosis.

Como se ha indicado arriba, la osteoporosis puede ser resultado también de una afección asociada con otro trastorno o del uso de ciertas medicaciones. La osteoporosis resultante de fármacos u otra afección médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una afección conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad excesiva de cortisol producida por el cuerpo da como resultado osteoporosis y fracturas. Las medicaciones más comunes asociadas con la osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque niveles adecuados de hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroides) son necesarios para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormona tiroidea puede reducir la masa ósea a lo largo del tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden conducir a pérdida ósea cuando se toman en dosis altas por personas con problemas renales, particularmente las personas sometidas a diálisis. Otras medicaciones que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbituratos que se utilizan para prevenir los ataques epilépticos; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un fármaco para algunas formas de artritis, cáncer, y trastornos inmunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un fármaco utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para suprimir el sistema inmunitario en pacientes sometidos a trasplantes de órganos; agonistas hormonales liberadores de la hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), utilizados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemín), una medicación anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), utilizados para tratar el colesterol alto. La pérdida ósea resultante de la terapia del cáncer está ampliamente reconocida y se conoce como pérdida ósea inducida por la terapia del cáncer (CTIBL). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden corregirse por tratamiento con antagonistas de activina-ActRIIa.

En una realización preferida, las composiciones de la invención pueden utilizarse en pacientes de cáncer. Los pacientes que presentan ciertos tumores (v.g. mieloma múltiple) pueden tratarse con el antagonista de activina-ActRIIa reivindicado incluso en ausencia de evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas. Los pacientes pueden monitorizarse también en cuanto a la evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas, y pueden tratarse con antagonistas de activina-ActRIIa en el caso de que los indicadores sugieran un riesgo incrementado. Generalmente, se emplean escaneos DEXA para evaluar los cambios en densidad ósea, si bien pueden utilizarse indicadores de remodelación ósea para evaluar la probabilidad de metástasis óseas. Los marcadores séricos pueden monitorizarse. La fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP) es una enzima que está presente en los osteoblastos. Los niveles en sangre de BSAP están incrementados en los pacientes con metástasis óseas y otras afecciones que dan como resultado remodelación ósea incrementada. La osteocalcina y los péptidos pro-colágeno están asociados también con la formación de hueso y las metástasis óseas. Se han detectado aumentos en BSAP en pacientes con metástasis óseas causadas por cáncer de próstata, y en menor grado en metástasis óseas de cáncer de mama. Los niveles de Proteína Morfogénica Ósea 7 (BMP-7) son altos en el cáncer de próstata que ha producido metástasis en hueso, pero no en las metástasis óseas debidas a cáncer de vejiga, piel, hígado, o pulmón. El telopéptido carboxi-terminal tipo I (ICTP) es una reticulación encontrada en colágeno que se forma durante la reabsorción de hueso. Dado que el hueso está rompiéndose y reformándose constantemente, el ICTP se encontrará en todo el cuerpo. Sin embargo, en el sitio de una metástasis ósea, el nivel será significativamente mayor que en un área de hueso normal. Se ha encontrado ICTP en niveles altos en metástasis óseas debidas a cáncer de próstata, pulmón, y mama. Otra reticulación de colágeno, el telopéptido N-terminal tipo I (NTx), se produce junto con ICTP durante la renovación ósea. La cantidad de NTx se incrementa en metástasis óseas causadas por muchos tipos diferentes de cáncer que incluyen cáncer de pulmón, próstata, y mama. Asimismo, los niveles de NTx aumentan con la progresión de las metástasis óseas. Por tanto, este marcador puede utilizarse no sólo para detectar las metástasis sino también como medida de la extensión de la enfermedad. Otros marcadores de reabsorción incluyen piridinolina y desoxipiridinolina. Cualquier aumento en los marcadores de reabsorción o marcadores de metástasis óseas indica la necesidad de terapia con antagonistas de activina-ActRIIa en un paciente.

Los antagonistas de activina-ActRIIa pueden administrarse conjuntamente con otros agentes farmacéuticos. La administración conjunta puede realizarse por administración de una co-formulación simple, por administración simultánea o por administración en momentos separados. Los antagonistas de activina-ActRIIa pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros agentes de actividad ósea. Un paciente puede beneficiarse de recibir conjuntamente antagonista de activina-ActRIIa y tomar suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio apropiado y/o, en algunos casos, otra medicación. Ejemplos de otras medicaciones incluyen bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, y raloxifeno afectan al ciclo de remodelación ósea y se clasifican como medicaciones anti-reabsorción. La remodelación ósea está constituida por dos etapas distintas: reabsorción de hueso y formación de hueso. Las medicaciones anti-reabsorción ralentizan o detienen la porción de reabsorción ósea del ciclo de remodelación del hueso pero no ralentizan la porción de formación ósea del ciclo. Como resultado, la neoformación continúa a un ritmo mayor que la reabsorción ósea, y la densidad ósea puede aumentar a lo largo del tiempo. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, aumenta la velocidad de formación de hueso en el ciclo de remodelación ósea. El alendronato está aprobado tanto para la prevención (5 mg por día o 35 mg una vez por semana) como para el tratamiento (10 mg por día o 70 mg una vez a la semana) de la osteoporosis postmenopáusica. El alendronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral, muñeca y cadera. El alendronato está aprobado también para

el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres como resultado del uso a largo plazo de estas medicaciones (a saber, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de la osteoporosis en los hombres. El alendronato más vitamina D está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (70 mg una vez a la semana más vitamina D), y para el tratamiento con objeto de mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis. El ibandronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Tomado como una píldora de una vez al mes (150 mg), el ibandronato debería tomarse el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral. El risedronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica: tomado diariamente (dosis de 5 mg) o semanalmente (dosis de 35 mg o dosis de 35 mg con calcio), el risedronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral y de otros órganos. El risedronato está aprobado también para uso por hombres y mujeres con objeto de prevenir y/o tratar la osteoporosis inducida por glucocorticoides que es resultado del uso a largo plazo de estas medicaciones (a saber, prednisona o cortisona). La calcitonina es una hormona existente naturalmente implicada en la regulación del calcio y el metabolismo de los huesos. En las mujeres edad mayor que 5 años después de la menopausia, la calcitonina ralentiza la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea de la columna vertebral, y puede aliviar el dolor asociado con las fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral. La calcitonina está disponible como una inyección (50-100 UI diariamente) o pulverización nasal (200 UI diariamente). La terapia con estrógenos (ET)/terapia hormonal (HT) está aprobada para la prevención de la osteoporosis. Se ha demostrado que ET reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea tanto en columna vertebral como en cadera, y reduce el riesgo de fracturas de cadera y columna vertebral en las mujeres postmenopáusicas. ET se administra más comúnmente en la forma de una píldora o parche en la piel que suministra una dosis baja de aproximadamente 0,3 mg diariamente o una dosis estándar de aproximadamente 0,625 mg diariamente y es eficaz incluso cuando se inicia después de la edad de 70 años. Cuando se toma estrógeno solo, puede aumentar el riesgo para una mujer de desarrollar cáncer del revestimiento uterino (cáncer endometrial). Para eliminar este riesgo, el personal sanitario prescribe la hormona progestina en combinación con estrógeno (terapia de reemplazamiento hormona o HT) para aquellas mujeres que tienen un útero intacto. La ET/HT alivia los síntomas menopáusicos y se ha demostrado que tienen un efecto beneficioso sobre la salud ósea. Efectos secundarios pueden incluir hemorragia vaginal, dolor en el pecho, alteraciones del estado de ánimo y enfermedad de la vesícula biliar. El Raloxifeno, 60 mg al día, está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Esta sustancia pertenece a una clase de fármacos denominados Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (SERMs) que han sido desarrollados para proporcionar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin sus desventajas potenciales. El raloxifeno aumenta la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral. No se dispone todavía de datos para demostrar que raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras no localizadas en la columna vertebral. La Teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y hombres que se encuentran en riesgo elevado de sufrir una fractura. Esta medicación estimula la formación de hueso nuevo y aumenta significativamente la densidad mineral ósea. En las mujeres postmenopáusicas, se observó reducción de las fracturas en columna vertebral, cadera, pies, costillas y muñecas. En los hombres, se observó reducción de las fracturas en la columna vertebral, pero no se disponía de datos suficientes para evaluar la reducción de fracturas en otros sitios. La teriparatida se utiliza como auto-administración en forma de una inyección diaria durante hasta 24 meses.

7. Las Composiciones Farmacéuticas de la invención se definen en las reivindicaciones 1-11

En ciertas realizaciones, los antagonistas activina-ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa) de la presente invención se formulan con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los presentes compuestos pueden formularse para administración de cualquier manera conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

Las composiciones pueden administrarse sistémicamente, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención se encuentra en una forma fisiológicamente aceptable exenta de pirógenos. Agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de ActRIIa que pueden incluirse también opcionalmente en la comparación como se ha descrito arriba, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los presentes compuestos (v.g., polipéptidos ActRIIa) en los métodos de la invención.

Típicamente, los antagonistas de ActRIIa se administrarán por vía parenteral, y particularmente por vía intravenosa o subcutánea. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRIIa en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de su utilización, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor destinado o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y análogos), y mixturas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse

una fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de agentes tensioactivos.

Adicionalmente, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para suministro a un sitio de tejido diana (v.g., hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (v.g., polipéptidos ActRIIa) a un sitio de tejido diana (v.g., hueso), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y capaz óptimamente de ser reabsorbida en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar liberación lenta de los polipéptidos ActRIIa. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material matriz está basada en biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las presentes composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, poli(ácido láctico) y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y están bien definidos biológicamente, tales como hueso o colágeno dérmico. Matrices adicionales están constituidas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y están definidas químicamente, tales como hidroxiapatito sinterizado, Bioglass, aluminatos, u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar constituidas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como poli(ácido láctico) e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos pueden estar alterados en composición, por ejemplo en aluminato-fosfato de calcio y procesamiento para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula, y biodegradabilidad.

Las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral, v.g., en la forma de cápsulas, bolsitas, píldoras, tabletas, pastillas (utilizando una base saborizada, usualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o en forma de pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como elixires bucales y análogos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente puede administrarse también como un bolus, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y análogos), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención pueden mezclarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglomerantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y tierra de bentonítica; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril-sulfato de sodio, y mixturas de los mismos, y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tampón. Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina con relleno blando y duro utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de peso molecular alto y análogos.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, 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 semilla de algodón, aceite de cacahuete, de maíz, de germen de trigo, de oliva, de ricino, y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mixturas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, y agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes, y conservantes.

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

Las composiciones de la invención pueden contener también adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabén, clorobutanol, ácido fenol-sórbico, y análogos. Puede ser deseable también incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y análogos en las composiciones. Adicionalmente, la absorción prolongada de la forma

farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Debe entenderse que el régimen de dosificación será determinado por el médico responsable del tratamiento considerando diversos factores que modifican la acción de los presentes compuestos de la invención (v.g., polipéptidos ActR11a). Los diversos factores incluyen, pero sin carácter limitante, la cantidad de peso óseo que se desea formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio del deterioro óseo, la afección del hueso lesionado, la edad, sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a la pérdida ósea, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz utilizada en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final puede afectar también a la dosificación. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación ósea, por ejemplo rayos X (con inclusión de DEXA), determinaciones histomorfométricas, y marcación con tetraciclina.

10 Experimentos con primates y humanos han demostrado que los efectos de ActR11a-Fc sobre el hueso son detectables cuando el compuesto se dosifica a intervalos y cantidades suficientes para alcanzar concentraciones séricas de aproximadamente 200 ng/ml, apareciendo los efectos semimáximos sobre los biomarcadores anabólicos óseos a una dosis de 0,3 mg/kg o el equivalente en términos de área bajo la curva. En los humanos, pueden alcanzarse niveles séricos de 200 ng/ml con una sola dosis de 0,1 mg/kg o mayor y pueden alcanzarse niveles séricos de 1000 ng/ml con una sola dosis de 0,3 mg/kg o mayor. La semivida en suero de la molécula observada está comprendida entre aproximadamente 25 y 35 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión Fc, y por tanto puede conseguirse un nivel sérico eficaz sostenido, por ejemplo, por dosificación con aproximadamente 0,05 a 0,5 mg/kg sobre una base semanal o bisemanal, o bien pueden utilizarse dosis mayores con intervalos más largos entre las dosificaciones. Por ejemplo, podrían utilizarse dosis de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,2 ó 3 mg/kg o valores comprendidos entre ellos, sobre una base mensual o bimensual, y el efecto sobre el hueso puede ser suficientemente duradero, de tal modo que la dosificación sea necesaria una sola vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses. Los intervalos más largos entre las dosis se ven respaldados adicionalmente por la duración del efecto farmacodinámico, que es más largo que la duración del fármaco en el suero. Se observan efectos PD durante al menos 120 días en pacientes humanos.

15 La terapia génica puede utilizarse para la producción in vivo de polipéptidos ActR11a. Dicha terapia podría conseguir su efecto terapéutico por introducción de las secuencias de polinucleótidos ActR11a en células o tejidos que presenten los trastornos enumerados anteriormente. El suministro de las secuencias de polinucleótidos ActR11a puede realizarse utilizando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para el suministro terapéutico de las secuencias de polinucleótidos ActR11a se prefiere el uso de liposomas direccionados.

20 Diversos vectores virales que pueden utilizarse para terapia génica como se ha expuesto en esta memoria, incluyen adenovirus, herpesvirus, vaccinia, o, preferiblemente, un virus de RNA tal como un retrovirus.

25 Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los cuales puede insertarse un solo gen extraño incluyen, pero sin carácter limitante: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Cierta número de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar genes múltiples. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de tal modo que las células transducidas pueden identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de diana por fijación, por ejemplo, de un azúcar, un glicolípido, o una proteína. El direccionamiento preferido se realiza por utilización de un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden insertarse secuencias polinucleotídicas específicas en el genoma retroviral o fijarse a una envoltura viral a fin de permitir el suministro específico a la diana del vector retroviral que contiene el polipéptido ActR11a. En una realización preferida, el vector está direccionado a hueso o cartílago.

30 Alternativamente, células de cultivo de tejido pueden transfectarse directamente con plásmidos que codifican los genes retrovirales estructurales gag, pol y env, por transfección convencional con fosfato de calcio. Estas células se transfectan luego con el plásmido del vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

35 Otro sistema de suministro direccionado para nucleótidos ActR11a es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, cuentas, y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro in vitro e in vivo. RNA, DNA y viriones intactos pueden encapsularse en el interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, v.g., Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Métodos para transferencia eficiente de genes utilizando un vehículo de liposoma se conocen en la técnica, véase, v.g., Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma es usualmente una combinación de fosfolípidos, a menudo en combinación con esteroides, especialmente colesterol. Pueden utilizarse

también otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

Ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatídicos, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos. Fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas es asimismo posible basándose, por ejemplo, en especificidad de órgano, especificidad de célula, y especificidad de orgánulo, y es conocido en la técnica.

- 5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Proteínas de Fusión ActR11a-Fc

- 10 Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActR11a soluble que tiene el dominio extracelular de ActR11a humana fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo intercalado. Se hace referencia a los constructos como ActR11a-hFc y ActR11a-mFc, respectivamente.

ActR11a-hFc se muestra a continuación tal como se purifica a partir de líneas de células CHO (SEQ ID NO: 7):

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
 PPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK**

- 15 Las proteínas ActR11a-hFc y ActR11a-mFc se expresaron en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias conductoras diferentes:

- (i) Melitina de Abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- (ii) Activador del Plasminógeno Tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- (iii) Nativa: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

- 20 La forma seleccionada emplea el conductor TPA y tiene la secuencia de aminoácidos sin procesar siguiente:

**MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
 GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
 NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
 PKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK

 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)**

Este polipéptido está codificado por la secuencia de ácido nucleico siguiente:

Día 3: Se añaden factores (diluidos en medio + 0,1% BSA). Los inhibidores requieren preincubación con los Factores durante una hora antes de adición a las células. Seis horas más tarde, se lavan las células con PBS y se lisan las células.

5 Esto va seguido por un ensayo de Luciferasa. Típicamente, en este ensayo, en ausencia de cualesquiera inhibidores, la activina A exhibe aproximadamente una estimulación 10 veces mayor de la expresión del gen informador y un valor DE_{50} de 2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces mayor, $DE_{50} = \sim 1,5$ ng/ml. GDF-8 exhibe un efecto similar a DGF-11.

10 Como se muestra en la Figura 4, ActR11a-hFc y ActR11a-mFc inhiben la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares. Como se muestra en la Figura 5, tres preparaciones diferentes de ActR11a-hFc inhibían la señalización de GDF-11 con un valor CI_{50} de aproximadamente 200 pM.

15 La ActR11a-hFc era muy estable en estudios farmacocinéticos. Se dosificaron ratas con 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActR11a-hFc y se midieron los niveles en plasma de la proteína después de 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio separado, se dosificaron ratas a 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En las ratas, ActR11a-hFc tenía una semivida en suero de 11-14 días y los niveles circulantes del fármaco eran muy altos después de 2 semanas (11 μ g/ml, 110 μ g/ml o 304 μ g/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.) En monos *Cynomolgus*, la semivida en plasma era sustancialmente mayor que 14 días y los niveles circulantes del fármaco eran 25 μ g/ml, 304 μ g/ml o 140 μ g/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente. Los resultados preliminares en humanos sugieren que la semivida en suero está comprendida entre aproximadamente 20 y 30 días.

20 Ejemplo 2: ActR11a-mFc Promueve el Crecimiento Óseo In Vivo (no es parte de la invención)

Se dosificaron ratones hembra normales (BALB/c) con ActR11a-mFc a un nivel de 1 mg/kg/dosis, 3 mg/kg/dosis o 10 mg/kg/dosis, administrándose las dosis dos veces por semana. Se determinaron la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo por DEXA, véase la Figura 6.

25 En los ratones hembra BALB/c, los escaneos DEXA exhibieron un aumento significativo (> 20%) en la densidad y el contenido mineral óseo como resultado del tratamiento con ActR11a-mFc. Véanse las Figuras 7 y 8.

Así pues, el antagonismo de ActR11a causaba densidad y contenido minerales óseos incrementados en los ratones hembra normales. Como paso adicional, se testó el efecto de ActR11a-mFc sobre el hueso en un modelo de osteoporosis en ratones.

30 Andersson et al. (2001), establecieron que los ratones ovariectomizados sufrían pérdida ósea sustancial (aproximadamente 50% menos de hueso trabecular 6 semanas después de la operación), y que la pérdida ósea en estos ratones podría corregirse con agentes terapéuticos candidato, tales como hormona paratiroidea.

35 Los solicitantes utilizaron ratones hembra C57BL6 que se habían sometido a ovariectomía (OVX) o se habían operado falsamente a las 4-5 semanas de edad. Ocho semanas después de la cirugía, se inició un tratamiento con ActR11a-mFc (10 mg/kg, 2 veces por semana) o control (PBS). La densidad ósea se midió por medio de un escáner CT.

40 Como se muestra en la Figura 9, los ratones ovariectomizados sin tratar exhibían una pérdida sustancial de densidad ósea trabecular con relación a los controles falsamente operados después de 6 semanas. El tratamiento con ActR11a-mFc restablecía la densidad ósea al nivel de los ratones falsamente operados. A las 6 y 12 semanas del tratamiento, ActR11a-mFc causaba un aumento sustancial en el hueso trabecular de los ratones OVX. Véase la Figura 10. Después de 6 semanas de tratamiento, la densidad ósea aumentaba en un 24% con relación a los controles PBS. Después de 12 semanas, el aumento era 27%.

En los ratones falsamente operados, ActR11a-mFc causaba también un aumento sustancial en el hueso trabecular. Véase la Figura 11. Después de 6 y 12 semanas, el tratamiento produjo un aumento de 35% con relación a los controles.

45 En una serie adicional de experimentos, ratones ovariectomizados (OVX) u falsamente operados como se ha descrito arriba se trataron con ActR11a-mFc (10 mg/kg, 2 veces por semana) o control (PBS) durante 12 semanas. Análogamente a los resultados descritos anteriormente para ActR11a-mFc, los ratones OVX que recibieron ActR11a-mFc exhibían un aumento en la densidad ósea trabecular de 15% tan pronto como 4 semanas después y 25% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 12). Los ratones falsamente operados que recibieron ActR11a-mFc exhibían análogamente un aumento en la densidad ósea trabecular de 22% tan pronto como 4 semanas después y de 32% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 13).

55 Después de 12 semanas de tratamiento con ActR11a-mFc, el análisis DEXA de cuerpo entero y del fémur ex vivo demostró que el tratamiento induce un aumento en la densidad ósea tanto en los ratones ovariectomizados como en los falsamente operados (Figuras 14A y 14B, respectivamente). Estos resultados se ven respaldados también por el análisis pQCT *ex vivo* de la diáfisis media femoral que demostró un aumento significativo en la densidad ósea total y

cortical después de 12 semanas de tratamiento con ActR11a-mFc. Los ratones ovariectomizados de control tratados con vehículo exhibían densidades óseas que eran comparables a los ratones falsamente operados de control tratados con vehículo (Figura 15). Además de la densidad ósea, el contenido de hueso aumentaba después del tratamiento con ActR11a-mFc. El análisis pQCT *ex vivo* de la diáfisis media femoral demostraba un incremento significativo en el contenido de hueso tanto total como cortical después de 12 semanas de tratamiento con ActR11a-mFc, mientras que tanto los ratones ovariectomizados como los ratones de control tratados con vehículo falsamente operados exhibían un contenido óseo comparable (Figura 16). El análisis pQCT *ex vivo* de la diáfisis media femoral demostró también que los ratones tratados con ActR11a-mFc no exhibían cambio en la circunferencia perióstica; sin embargo, el tratamiento con ActR11a-mFc dio como resultado una disminución en la circunferencia endosteal, que indicaba un aumento en el espesor cortical debido al crecimiento de la superficie interna del fémur (Figura 17).

El test mecánico de los fémures determinó que ActR11a-mFc era capaz de aumentar las características extrínsecas del hueso (carga máxima, solidez y energía de rotura) que contribuían a un aumento significativo en las propiedades intrínsecas (carga de rotura) de los huesos. Los ratones ovariectomizados tratados con ActR11a-mFc exhibían resistencia ósea incrementada hasta niveles más allá de los controles tratados con vehículo falsamente operados, indicando una inversión completa del fenotipo osteoporótico (Figura 18).

Estos datos demuestran que un antagonista de activina-ActR11a puede aumentar la densidad ósea en los ratones hembra normales y, adicionalmente, corregir defectos de densidad ósea, contenido de hueso, y finalmente resistencia ósea, en un modelo de osteoporosis en el ratón.

En una serie adicional de experimentos, se sometieron ratones a ovariectomía o se operaron falsamente después de 4 semanas, y comenzando en la semana 12 después recibieron placebo o ActR11a-mFc (2 veces/semana, 10 mg/kg) (a lo que se hace referencia también como RAP-11 en las Figuras 19-24), durante un periodo ulterior de 12 semanas. Se evaluaron una diversidad de parámetros óseos. Como se muestra en la Figura 19, ActR11a-mFc aumentaba las ratios de volumen óseo trabecular vertebral a volumen total (BV/TV) tanto en los ratones OVX como en los falsamente operados. ActR11a-mFc mejoraba también la arquitectura trabecular (Figura 20), aumentaba el espesor cortical (Figura 21) y aumentaba la resistencia ósea (Figura 22). Como se muestra en la Figura 23, ActR11a-mFc producía efectos deseables en un intervalo de dosis de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

Se realizó una histomorfometría ósea en un momento de dos semanas en los ratones falsamente operados. Estos datos, presentados en la Figura 24, demuestran que ActR11a-mFc tiene un efecto dual, inhibiendo la reabsorción ósea y promoviendo a la vez el crecimiento óseo. Así pues, ActR11a-mFc estimula el crecimiento óseo (efecto anabólico) e inhibe la reabsorción ósea (efecto anti-catabólico). BV = volumen óseo; TV = volumen tisular total. BV/TV es una medida del porcentaje de volumen óseo que está mineralizado. ES = superficie erosionada; BS = superficie ósea. ES/BS es una medida de la erosión ósea, y la disminución causada por RAP-011 demuestra un efecto anti-reabsorción o anti-catabólico. Ms/Bs es la ratio de superficie de mineralización/superficie ósea, que es un indicador del crecimiento óseo, o efecto anabólico. Análogamente, la tasa de aposición mineral (MAR) y la tasa de formación de hueso por superficie ósea y por día (BFR/BSd) indican crecimiento óseo. Las medidas de osteoblastos (Nob/BPm) y osteoclastos (Noc/BPm) se toman a fin de probar el mecanismo de acción.

Se condujo un segundo experimento de histomorfometría ósea en ratones C57BL/6 hembra, comenzando a una edad de 12 semanas. Los ratones se dosificaron intraperitonealmente dos veces por semana con 10 mg/kg de ActR11a-mFc durante 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas o 12 semanas. Cada grupo se sacrificó 5 días después de la última dosis y se extrajeron los huesos para análisis. Los ratones se marcaron con calceína 9 días y 2 días antes de la eutanasia. Como se muestra en la Figura 25, las medidas demuestran que ActR11a-mFc promueve el crecimiento y la mineralización óseos y tiene efectos tanto anabólicos como anti-catabólicos. Véase, por ejemplo la ratio BV/TV, la ratio ES/BS y la ratio MS/BS. Los efectos anabólicos parecen persistir a todo lo largo del régimen de dosificación, mientras que los efectos anti-reabsorción parecen ser de vida más corta en los ratones.

Ejemplo 3: ActR11a-mFc mejora o evita el deterioro óseo en un modelo murino de mieloma múltiple

Los pacientes de mieloma múltiple exhiben un trastorno de pérdida ósea caracterizado por actividad incrementada de los osteoclastos y formación reducida de hueso por los osteoblastos. El modelo 5T2MM de mieloma en los ratones está basado en el uso de células tumorales (células 5T2MM) de un tipo de tumor espontáneo que se desarrolla en los ratones viejos y causa efectos en los ratones que son similares a los observados en los pacientes humanos de mieloma múltiple. Véase, v.g., Vanderkerken et al., *Methods Mol Med.* 2005; 113:191-205. Se testó ActR11a-mFc en cuanto a efectos en este modelo.

Las células 5T2MM inyectadas en ratones C57Bl/KaLwRij promovían un aumento en la superficie de los osteoclastos, la formación de lesiones osteolíticas y causaban una disminución en el área ósea. La enfermedad ósea estaba asociada con una disminución en el número de osteoblastos, la superficie de los osteoblastos y una reducción en la mineralización.

Ratones portadores de células 5T2MM se trataron con ActR11a-mFc (RAP-011) (10 mg/kg, i.p. dos veces por semana), o vehículo, desde el momento de la inyección de 5T2MM, durante un total de 12 semanas. El análisis microCT de la tibia proximal y las vertebrae lumbares demostró una reducción de 39% y 21% en el volumen de

hueso esponjoso ($p < 0,001$ y $p < 0,01$) y una reducción de 37% y 15% en el número trabecular ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) en los ratones portadores de 5T2MM comparados con los ratones naif. RAP-011 impedía por completo las disminuciones inducidas por 5T2MM en el volumen y el número trabeculares tanto en la tibia ($p < 0,001$ y $p < 0,05$) como en las vértebras ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) cuando se compararon con los ratones tratados con vehículo. El volumen óseo era 19% mayor en la tibia ($p = 168$) y 12% mayor en las vértebras ($p < 0,05$) de los ratones tratados con RAP-011 cuando se compraban con ratones naif. RAP-011 impedía el desarrollo de lesiones óseas osteolíticas (p < 0,05). Este efecto se ilustra en la Figura 26. Si bien una evaluación preliminar de los datos no consiguió identificar efectos significativos sobre la paraproteína sérica (un biomarcador de las células tumorales del mieloma múltiple) o la carga de mieloma en este estudio, un análisis ulterior indicó que la paraproteína sérica había disminuido sustancialmente en todos excepto uno de los animales tratados, y adicionalmente que el volumen de médula ósea sana había aumentado sustancialmente, indicando una disminución en la carga de células tumorales de mieloma.

Por consiguiente, ActRIIa-mFc puede utilizarse para reducir los efectos de la enfermedad ósea resultante del mieloma múltiple y para tratar las células tumorales propiamente dichas.

15 Ejemplo 4: Caracterización de una Proteína ActRIIa-hFc

La proteína de fusión ActRIIa-hFc se expresaba en células CHO-DUKX B11 transfectadas de manera estable a partir de un vector pAID4 (SV40ori/intensificador, promotor CMV), utilizando una secuencia conductora del plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 9. La proteína, purificada como se ha descrito arriba en el Ejemplo 1, tenía una secuencia de SEQ ID NO: 7. La porción Fc es una secuencia Fc de IgG1 humana, como se muestra en SEQ ID NO: 7. El análisis de ácido siálico demostró que la proteína contenía, por término medio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIa-hFc.

Esta proteína purificada exhibía una semi-vida en suero notablemente larga en todos los animales testados, con inclusión de una semivida de 25-32 días en pacientes humanos (véase Ejemplo 5, más adelante). Adicionalmente, el material expresado por las células CHO tiene una mayor afinidad para el ligando activina B que la consignada para una proteína de fusión ActRIIa-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., J. Biol. Chem., 17 diciembre 2004; 279 (51):53126-35.) Adicionalmente, el uso de la secuencia conductora tPa proporcionaba mayor producción que otras secuencias conductoras y, al contrario que la ActRIIa-Fc expresada con un conductor nativo, proporcionaba una secuencia N-terminal de alta pureza. El uso de la secuencia conductora nativa dio como resultado dos especies principales de ActRIIa-Fc, cada una de las cuales tenía una secuencia N-terminal diferente.

30 Ejemplo 5: Prueba Clínica Humana (no es parte de la invención)

La proteína descrita en el Ejemplo 4 se administró a pacientes humanos en un estudio aleatorizado, doble ciego, y controlado por placebo que se condujo para evaluar, fundamentalmente, la seguridad de la proteína en mujeres postmenopáusicas sanas. Se distribuyeron aleatoriamente 48 mujeres en grupos de 6 para recibir o bien una dosis simple de ActRIIa-hFc o placebo (5 activas:placebo). Los niveles de dosis oscilaban desde 0,01 a 3,0 mg/kg por vía intravenosa (IV) y 0,03 a 0,1 mg/kg por vía subcutánea (SC). Todas las mujeres se siguieron durante 120 días. Las mujeres se excluyeron de participar en el estudio si tomaban medicamentos que afectasen al metabolismo óseo dentro de 6 meses de la entrada en el estudio. Se realizaron evaluaciones de seguridad siguiendo a cada grupo a fin de determinar la escalación de la dosis. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), se evaluó también la actividad biológica de ActRIIa-hFc por medida de marcadores bioquímicos de formación y reabsorción de hueso, así como los niveles de FSH.

No se consignó ningún suceso adverso grave en este estudio. Los sucesos adversos (Aes) fueron generalmente leves y transitorios. El análisis preliminar de los AEs incluía dolor de cabeza, valores de laboratorio elevados, síntomas de frío, emesis o vómito, infiltración intravenosa, y hematoma en el sitio de inyección.

El análisis PK de ActRIIa-hFc exhibía un perfil lineal con la dosis, y una semivida media de aproximadamente 25-32 días. El área bajo la curva (AUC) para ActRIIa-hFc estaba relacionada linealmente con la dosis, y la absorción después de la dosificación SC era esencialmente completa (véanse las Figuras 27 y 28). Estos datos indican que SC es un método deseable para la dosificación dado que proporciona biodisponibilidad y semivida en suero equivalentes para el fármaco al tiempo que evita el pico en concentraciones séricas de fármaco asociadas con los primeros pocos días de la dosificación IV (véase la Figura 28). ActRIIa-hFc causaba un aumento rápido y sostenido dependiente de la dosis en los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica de hueso (BAP), que es un marcador para el crecimiento anabólico óseo, y una disminución dependiente de la dosis en los niveles del telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 y fosfatasa ácida 5b resistente al tartrato, que son marcadores para la reabsorción ósea. Otros marcadores, tales como P1NP presentaban resultados no concluyentes. Los niveles de BAP exhibían efectos próximos a la saturación a la dosis máxima del fármaco, lo que indicaba que los efectos semimáximos de este biomarcador anabólico óseo podrían alcanzarse a una dosis de 0,3 mg/kg, con aumentos que llegaban hasta 3 mg/kg. Calculado como una interrelación de efecto farmacodinámico a AUC para el fármaco, el valor CE₅₀ es 51.465 (día * ng/ml). Véase la Figura 29. Estos cambios de biomarcadores óseos se mantenían durante aproximadamente 120 días a los niveles máximos de dosis testados. Se registraba también una disminución dependiente de la dosis en los niveles séricos de FSH consistente con la inhibición de la activina.

Una sola dosis de ActRIIa-hFc administrada a mujeres sanas postmenopáusicas era segura y bien tolerada para el intervalo de niveles de dosis testado. Los efectos prolongados PK y farmacodinámicos sugieren que una dosificación intermitente podría ser apropiada para estudios futuros. Por ejemplo, la dosificación sobre la base de semivida en suero podría realizarse sobre una base mensual, o del orden de una vez cada dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas. Adicionalmente, dado que los efectos farmacodinámicos se prolongan mucho más allá de la residencia del fármaco en suero, la dosificación podría realizarse sobre la base del efecto farmacodinámico, lo que significa que la dosificación cada tres meses o cada dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso doce meses puede ser eficaz para producir el efecto deseado en las pacientes. Esta prueba clínica demuestra que, en los humanos, ActRIIa-hFc es un agente osteoanabólico con evidencia biológica tanto de un aumento en la formación de hueso como de una disminución en la reabsorción ósea.

Ejemplo 6: Co-administración de ActRIIa-mFc y un Bisfosfonato

Los bisfosfonatos son una clase de fármacos que se utilizan ampliamente para tratar trastornos asociados con densidad mineral ósea baja, con inclusión de osteoporosis y pérdida ósea relacionada con el cáncer. Los bisfosfonatos tienen una actividad anti-reabsorción potente, inhibidora de los osteoclastos. Quizás porque los osteoclastos son necesarios tanto para la descomposición ósea como para el crecimiento óseo, los bisfosfonatos parecen disminuir los efectos de la hormona paratiroidea (PTH), uno de los únicos agentes de crecimiento anabólico óseo conocidos (Black et al., N Engl J Med, 25 de septiembre de 2003; 349 (13): 1207-15; Samadfam et al., Endocrinology, junio 2007; 148 (6): 2778-87).

Para testar la utilidad del tratamiento con ActRIIa-Fc en pacientes que habían recibido previamente o estaban recibiendo al mismo tiempo bisfosfonato u otra terapia anti-reabsorción, se testaron ratones con ActRIIa-mFc y zoledronato, un compuesto bisfosfonato, combinados. Se trataron ratones C57BL/6N de 12 semanas como sigue:

Grupo 1: PBS

Grupo 2: ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) dos veces por semana (con el Grupo 3 y 4)

Grupo 3: Ácido zoledrónico (ZOL), una sola dosis (20 mg/kg)

Grupo 4: ZOL (una dosis), y 3 días después ActRIIa-mFc (RAP-011) (1 mg/kg) dos veces por semana

Grupo 5: ZOL (una dosis), 3 días después ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) dos veces por semana.

Se determinó la BMD total por escaneo DEXA (P1XI) antes de la dosificación y a las 3 y 8 semanas de tratamiento.

Como se muestra en la Figura 30, la BMD total aumentaba notablemente en todos los grupos de tratamiento, produciendo la combinación de ZOL y ActRIIa-mFc los efectos máximos. Estos resultados indican que las proteínas ActRIIa-Fc pueden utilizarse para aumentar la densidad ósea, incluso en pacientes que han recibido terapia de bisfosfonato.

Ejemplo 7: ActRIIa-Fc Mejora o Evita la Pérdida Ósea Causada por las Metástasis de Cáncer de Mama (no es parte de la invención)

Se estima que el 65 a 75% de los cánceres de mama metastatizan en el hueso, causando deterioro sustancial a la estructura ósea, aumentando con ello el riesgo de fracturas y causando dolor y otros efectos secundarios. Se testaron los efectos de ActRIIa-Fc en un modelo de cáncer de mama en ratones que ha metastatizado en el hueso.

Una sublínea de la línea de células de cáncer de mama humanas MDA-MH-231 (clon 2287) se cultivó in vitro y se recogieron las células a una densidad de 5×10^6 células/ml. MDA-MB-231 es una línea de células que es altamente competente para siembra en hueso y que causa un deterioro óseo similar al causado por las metástasis óseas. Se inyectaron 10 ml de células en la tibia de 6 ratones lampiños atímicos hembra de 6 semanas el día 0 del estudio. El día 10 del estudio, los ratones recibieron ActRIIa-mFc (10 mg/kg/dos veces por semana/subcutánea) (n = 8) o vehículo de PBS (n = 7). Se evaluó la progresión de la enfermedad por absorciometría de rayos X de energía dual (PIXIMus) a intervalos semanales. Los ratones se trataron con ActRIIa-mFc durante 4 semanas y después de ello se sacrificaron y se extirparon las tibias (tanto las portadoras de tumor como las que no presentaban tumor) de cada animal. Se procesaron luego las tibias y se prepararon para microCT y análisis histológico.

La inyección intratibial de MDA-MB-231 en los ratones lampiños atímicos promovía el desarrollo de lesiones osteolíticas óseas en la tibia inyectada en comparación con la pata contralateral. El análisis MICROCT de la tibia proximal demostraba un 62% de reducción en el volumen de hueso esponjoso en las tibias que soportaban MDA-MB-231, comparadas con la tibia que no presentaba tumor en los ratones tratados con vehículo PBS. El tratamiento con ActRIIa-mFc conducía a un aumento de 70% o 147% en la tibia naif o portadora de tumor respectivamente, comparado con el vehículo (P < 0,01 para ambas). Las tibias portadoras de tumor de los ratones tratados con ActRIIa-mFc tenían una densidad de hueso esponjoso similar a las tibias naif de los ratones tratados con VEH (p = 0,39).

Así pues, ActRIIa-mFc es capaz de eliminar el deterioro óseo asociado con la presencia de células de tumor de mama en el hueso.

Ejemplo 8: Proteínas ActRIIa-Fc Alternativas

5 Un constructo alternativo puede tener una deleción de la cola C-terminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRIIa). La secuencia de un constructo de este tipo se presenta a continuación (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 12):

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP~~EMTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPVP~~IEKTISKAKGPRE
POVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYK~~ITPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFC~~SVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK~~~~~~~~**

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActRIIa-Fc expresada por células CHO, en la cual la proteína de fusión ActRIIa-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos que tienen cada uno una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 unidos por enlaces disulfuro, y en la cual el dímero tiene entre 3 y 5 restos de ácido siálico.
5
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la cual la proteína de fusión ActRIIa-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos de SEQ ID NO: 7, y en la cual uno o ambos polipéptidos tienen opcionalmente un aminoácido menos en los términos amino o carboxi que se muestran en SEQ ID NO: 7.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la cual la proteína de fusión ActRIIa-Fc se expresa recombinantemente en células CHO utilizando la secuencia conductora TPA de SEQ ID NO: 9.
10
4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el dímero tiene 4 restos de ácido siálico.
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una semivida en suero de 25 a 32 días por término medio en humanos sanos normales y biodisponibilidad equivalente cuando se administra por vía intravenosa o subcutánea.
15
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual la composición farmacéutica es adecuada para administración subcutánea.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una pureza de al menos 90% con respecto a otros componentes proteínicos.
20
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual dicha proteína de fusión ActRIIa-Fc incluye uno o más residuos de aminoácido modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico, y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.
25
9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un agente bisfosfonato.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la cual el agente bisfosfonato se selecciona de alendronato, ibandronato y risedronato.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActRIIa-Fc para uso en el tratamiento o la prevención del mieloma múltiple en un paciente humano, en la cual la composición farmacéutica es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 35 12. Uso de una proteína de fusión ActRIIa-Fc para la fabricación de un medicamento para tratamiento o prevención del mieloma múltiple en un paciente humano, en el cual la proteína de fusión ActRIIa-Fc es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

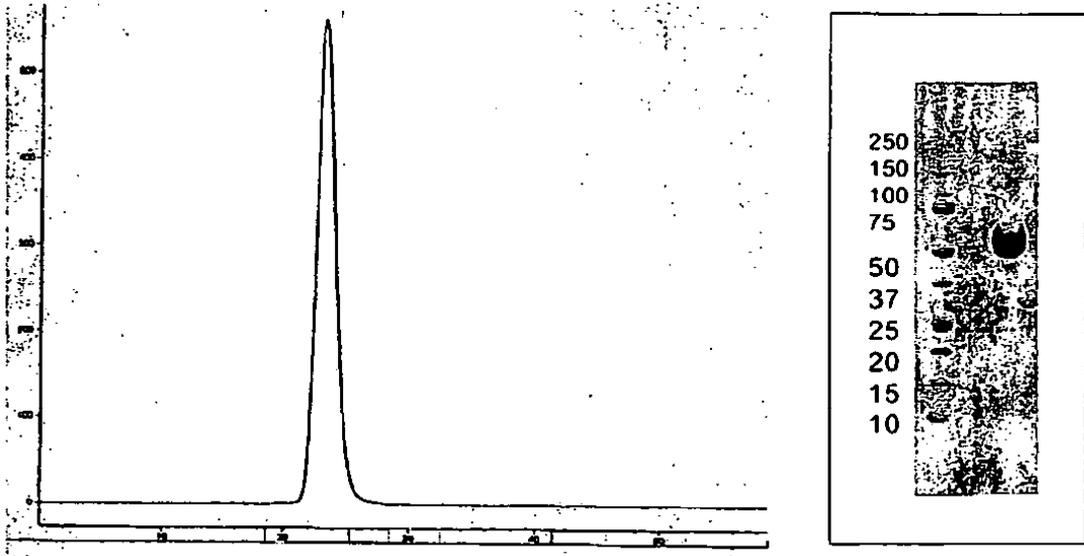


Figura 1

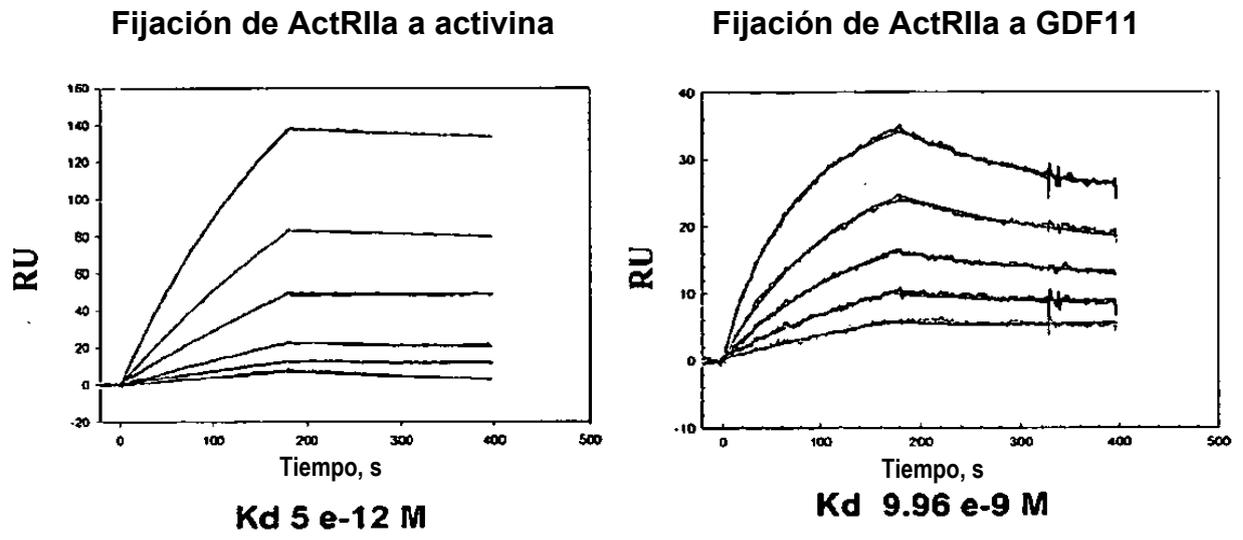


Figura 2

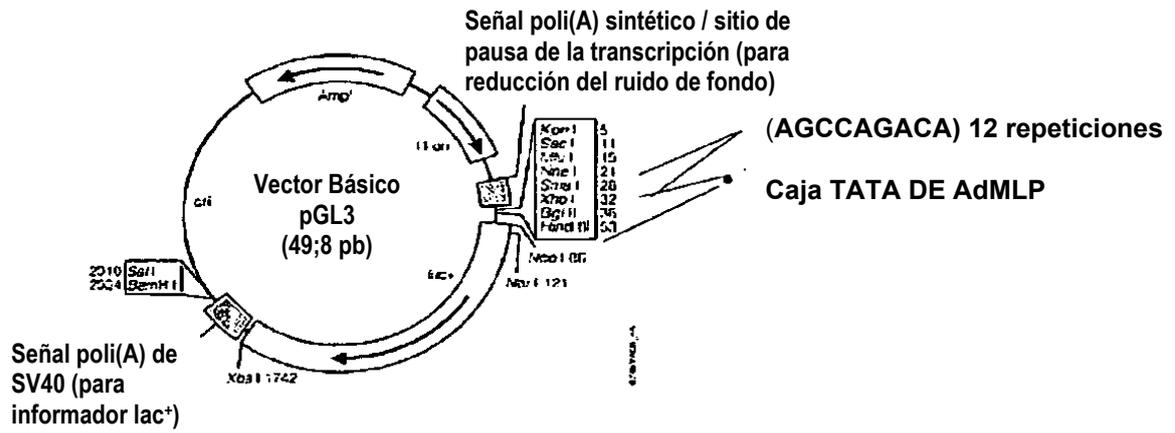


Figura 3

Inhibición de GDF-8 por ActR1IIa (Células A204)

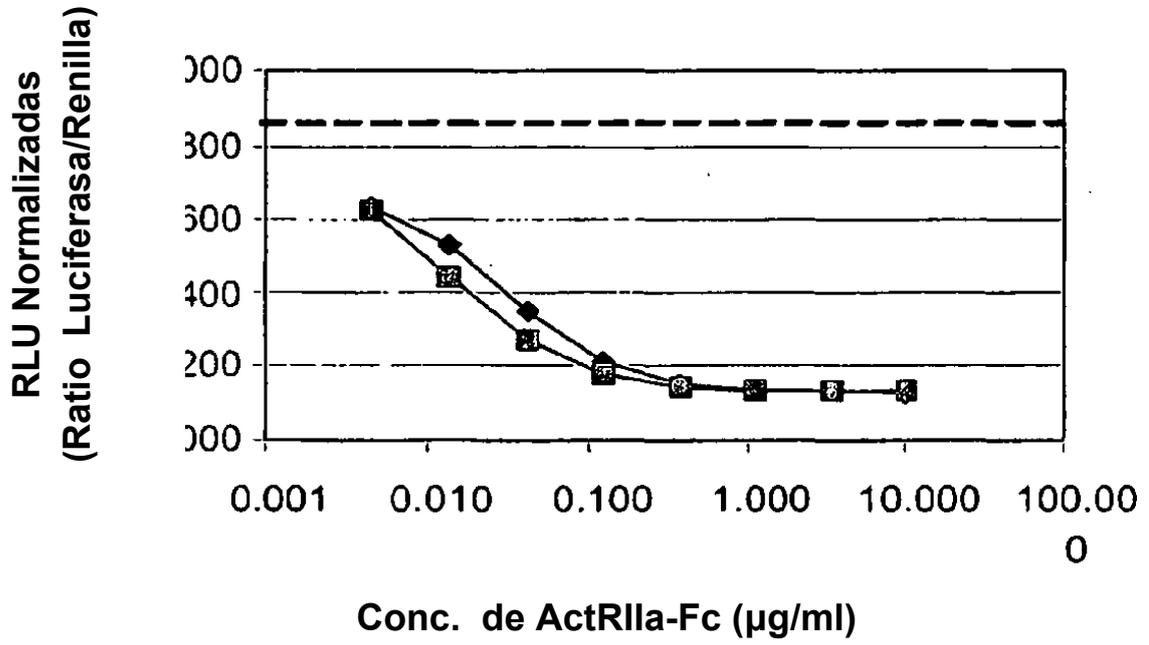


Figura 4

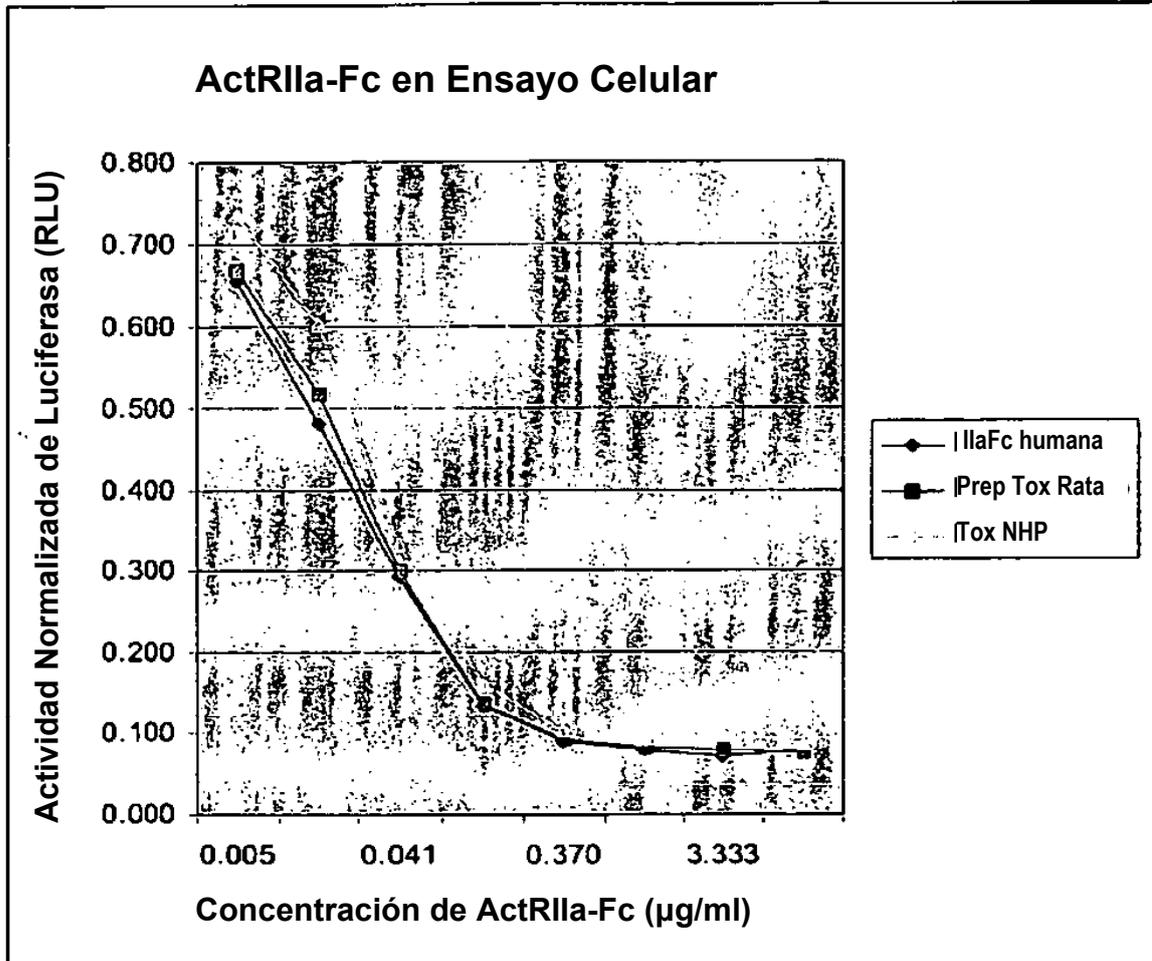


Figura 5

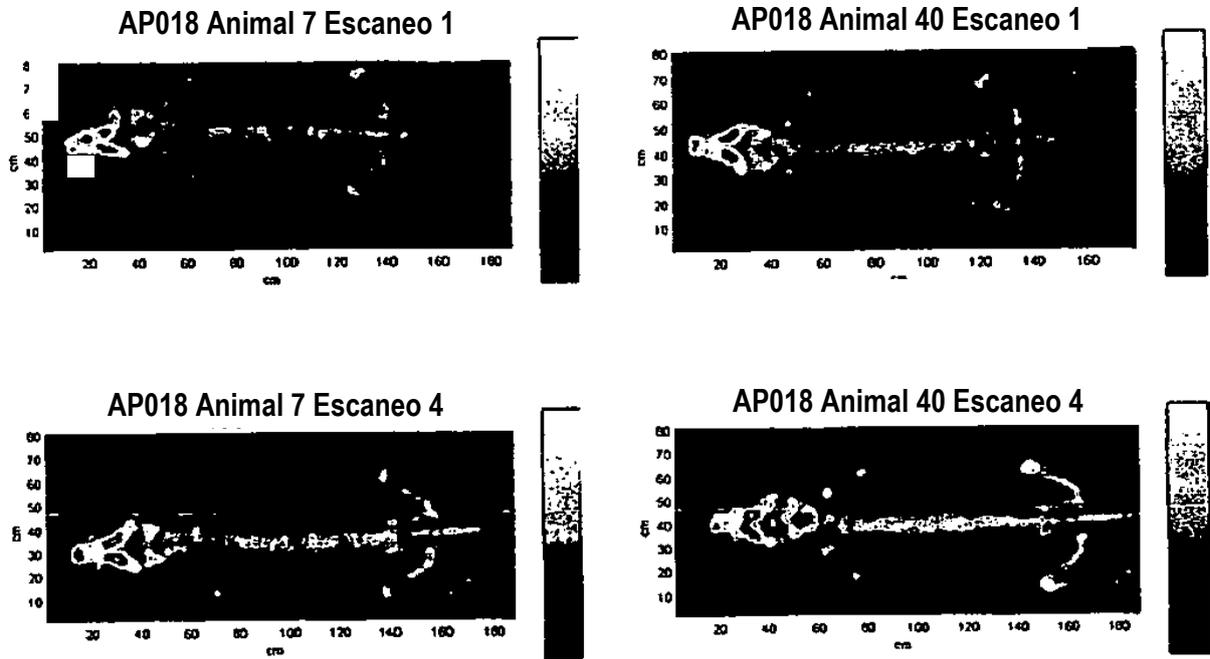


Figura 6

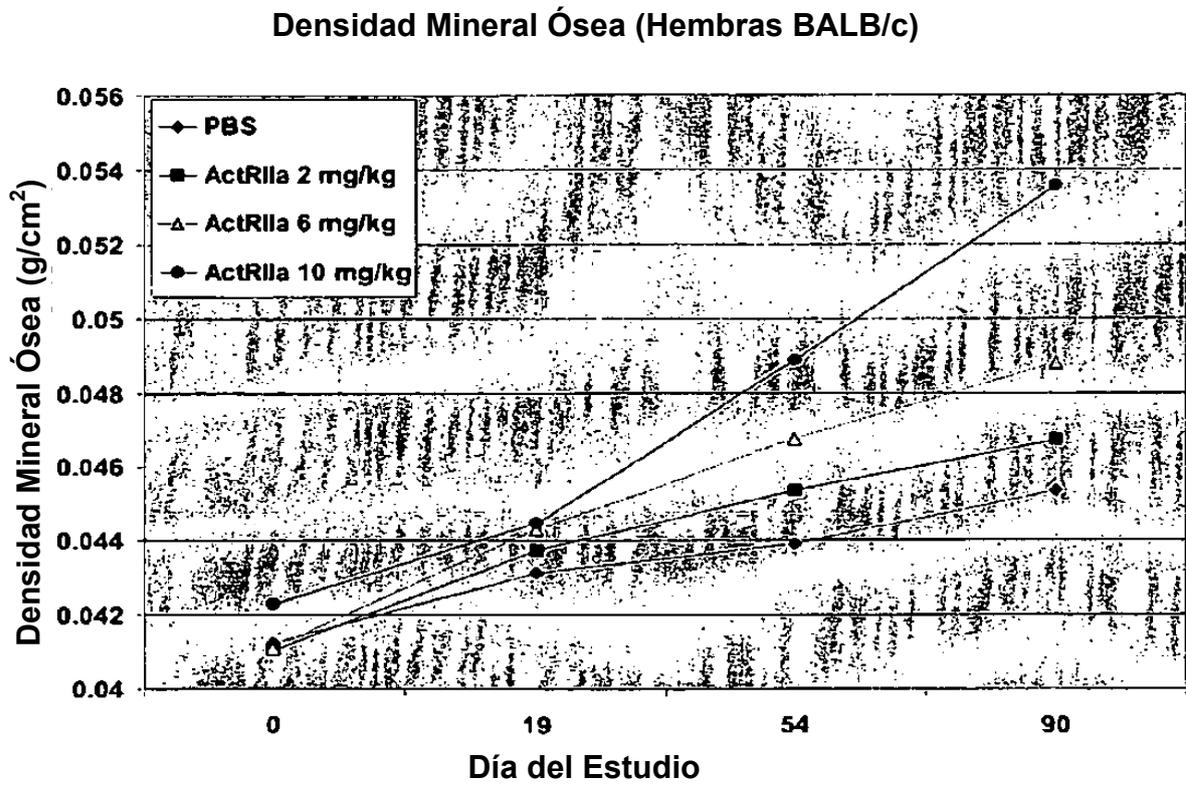


Figura 7

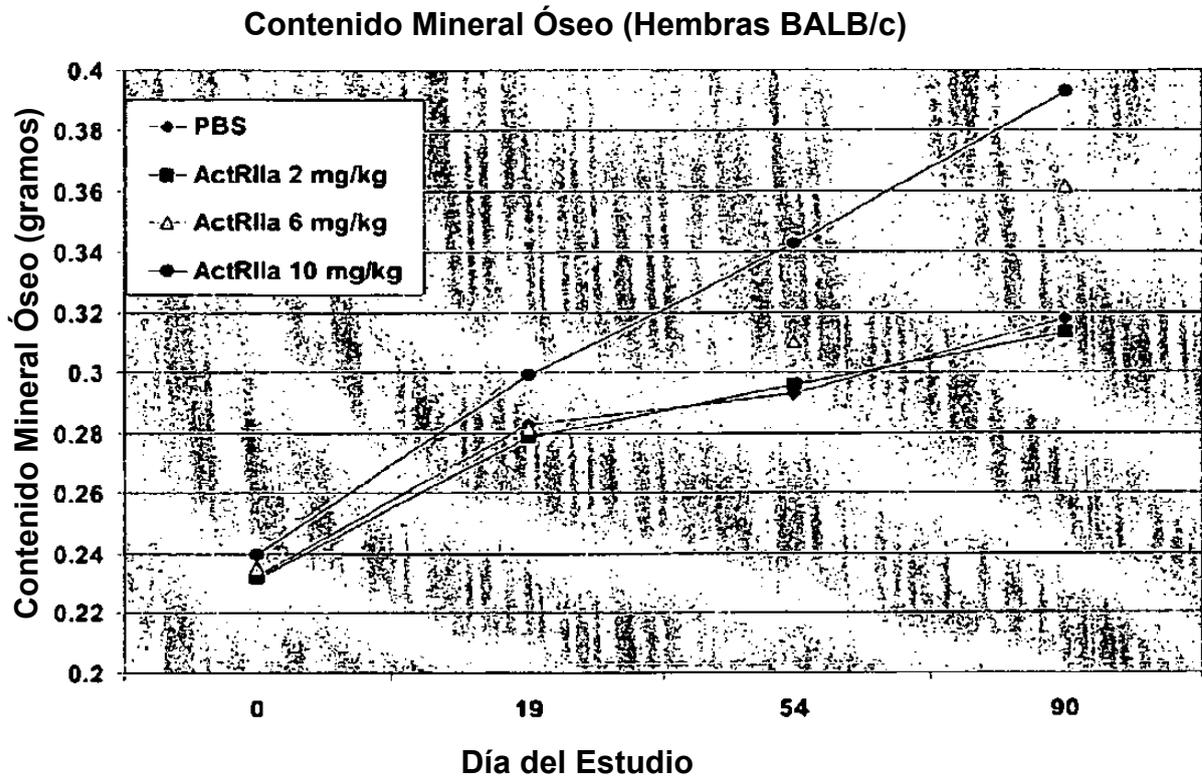


Figura 8

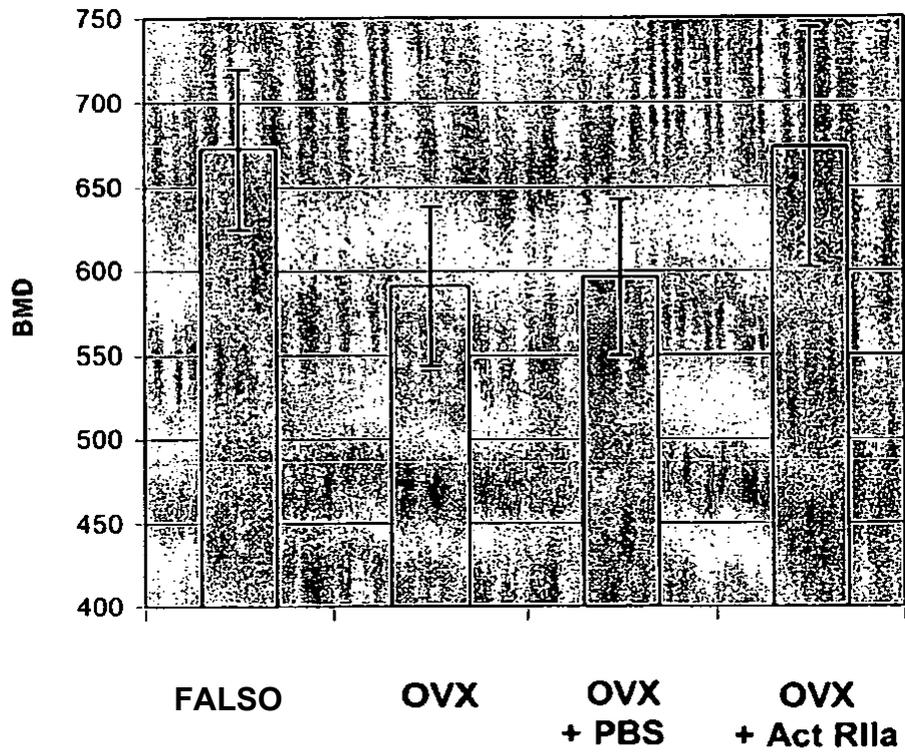


Figura 9

Hueso Trabecular (C57BL/6 ovariectomizadas)

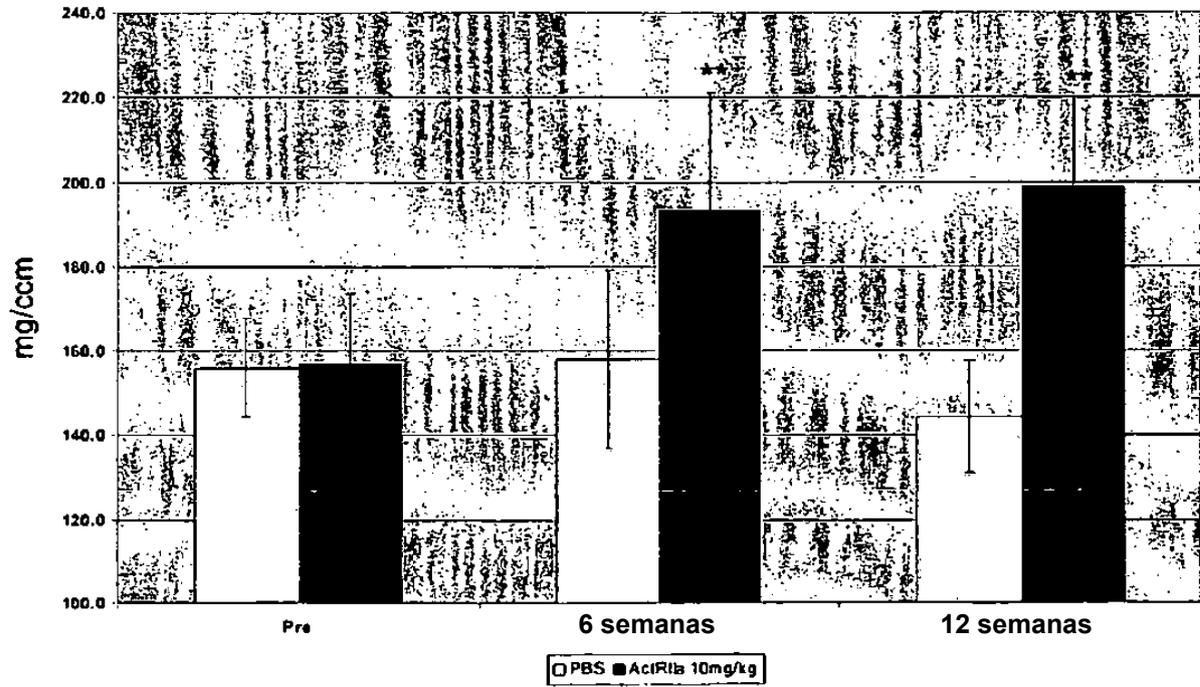


Figura 10

Hueso Trabecular (C57BL/6 falsas)

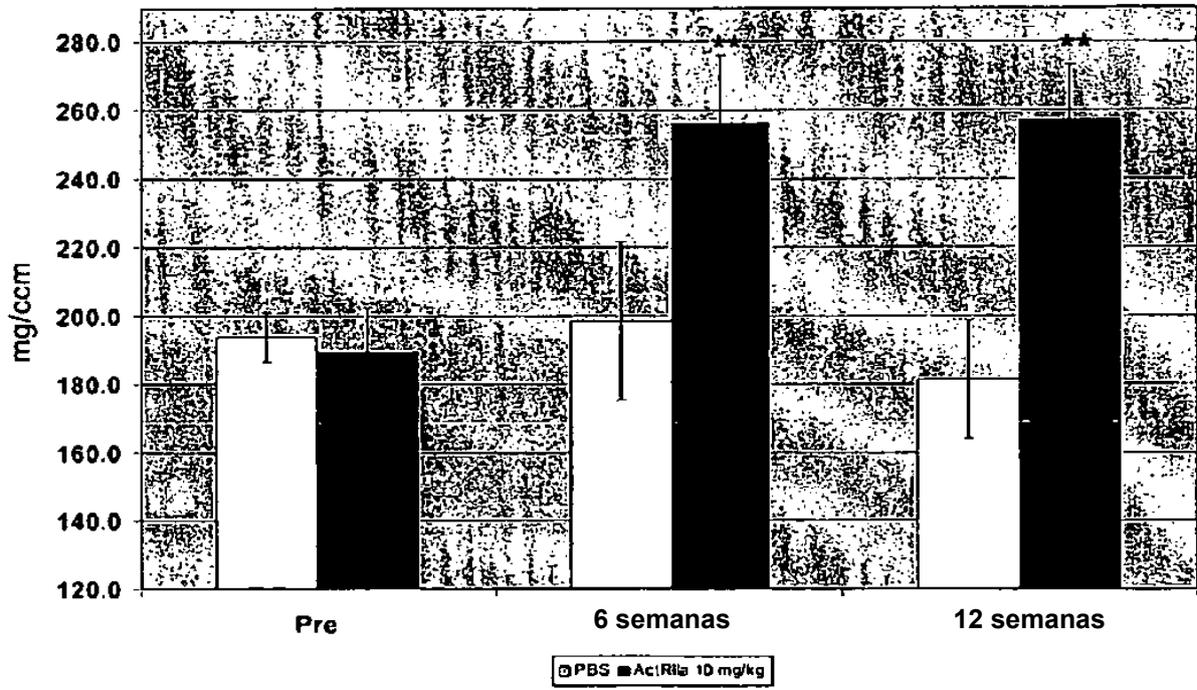


Figura 11

Densidad Ósea Trabecular Metafisaria (Ratones C57BL/6 ovariectomizados) [†]=P<0.01
^{**}=P<0.001

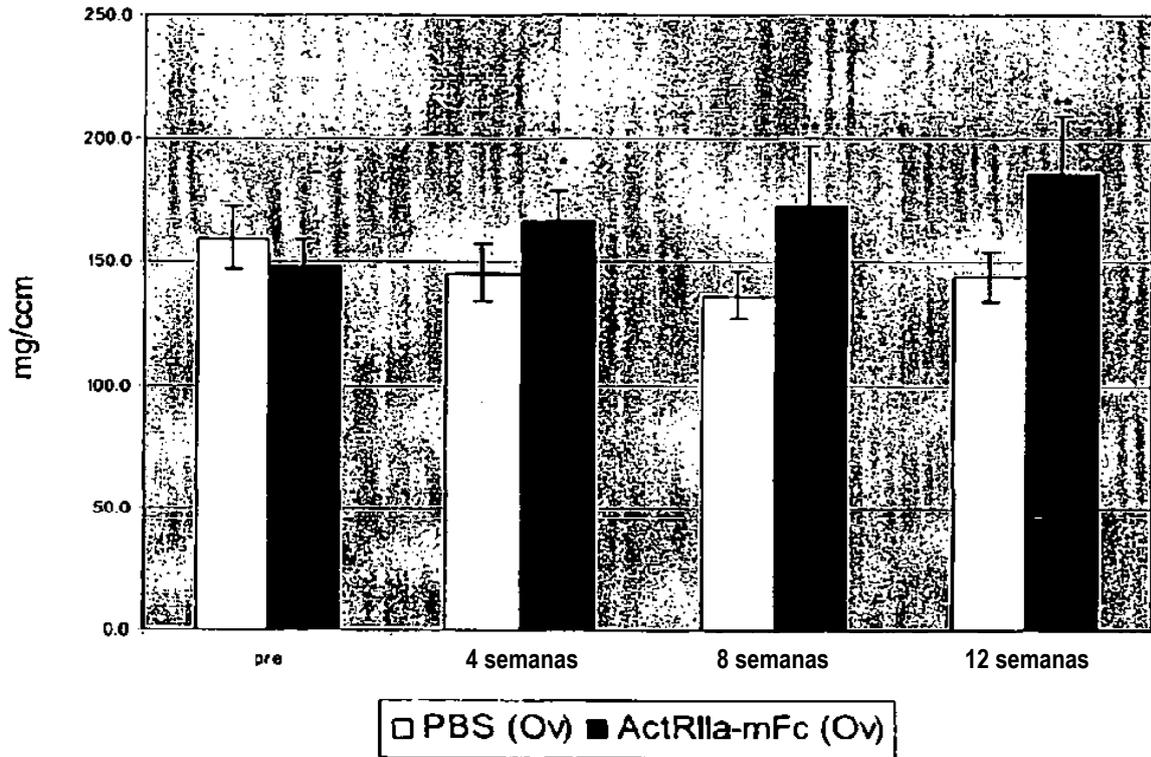


Figura 12

Densidad Ósea Trabecular Metafisaria (Ratones C57BL/6 falsamente operados)

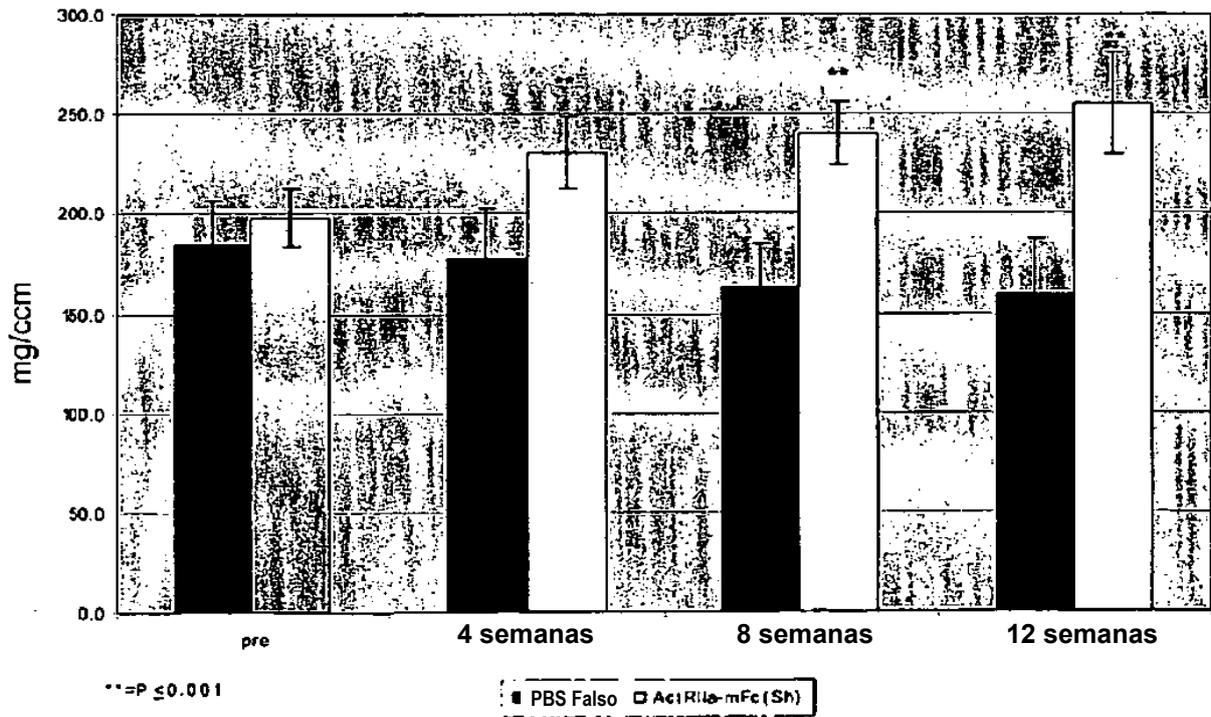


Figura 13

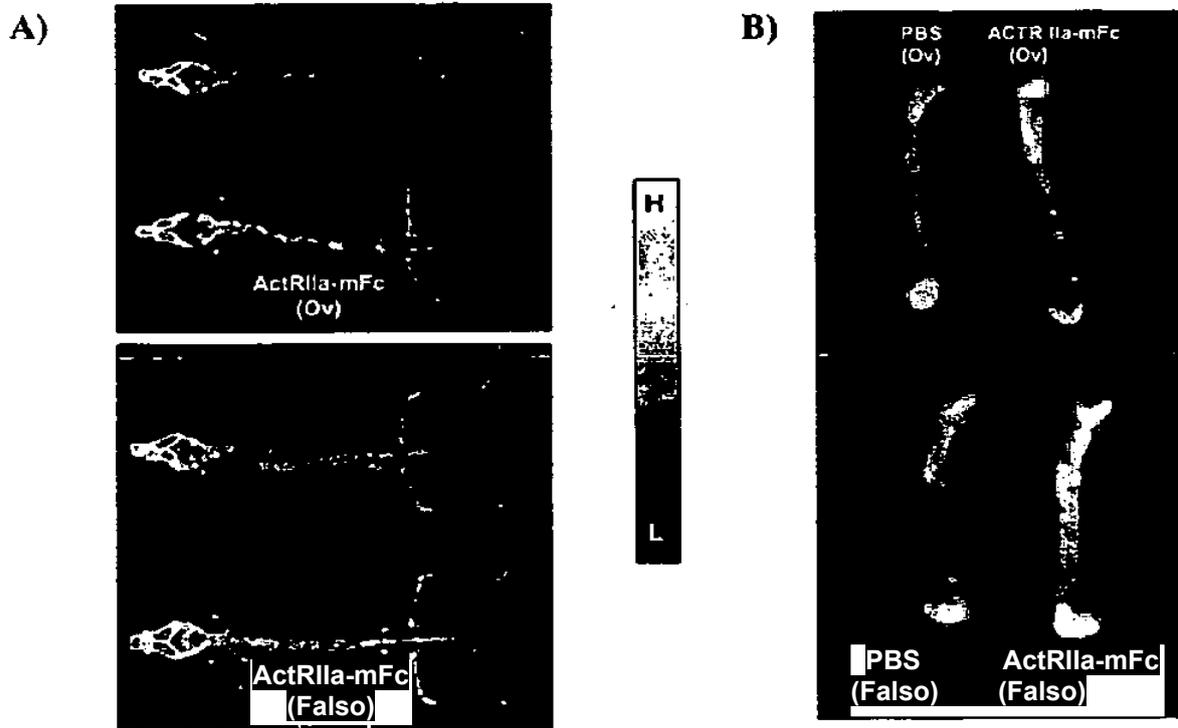


Figura 14

Densidad Ósea de los Fémures ex Vivo

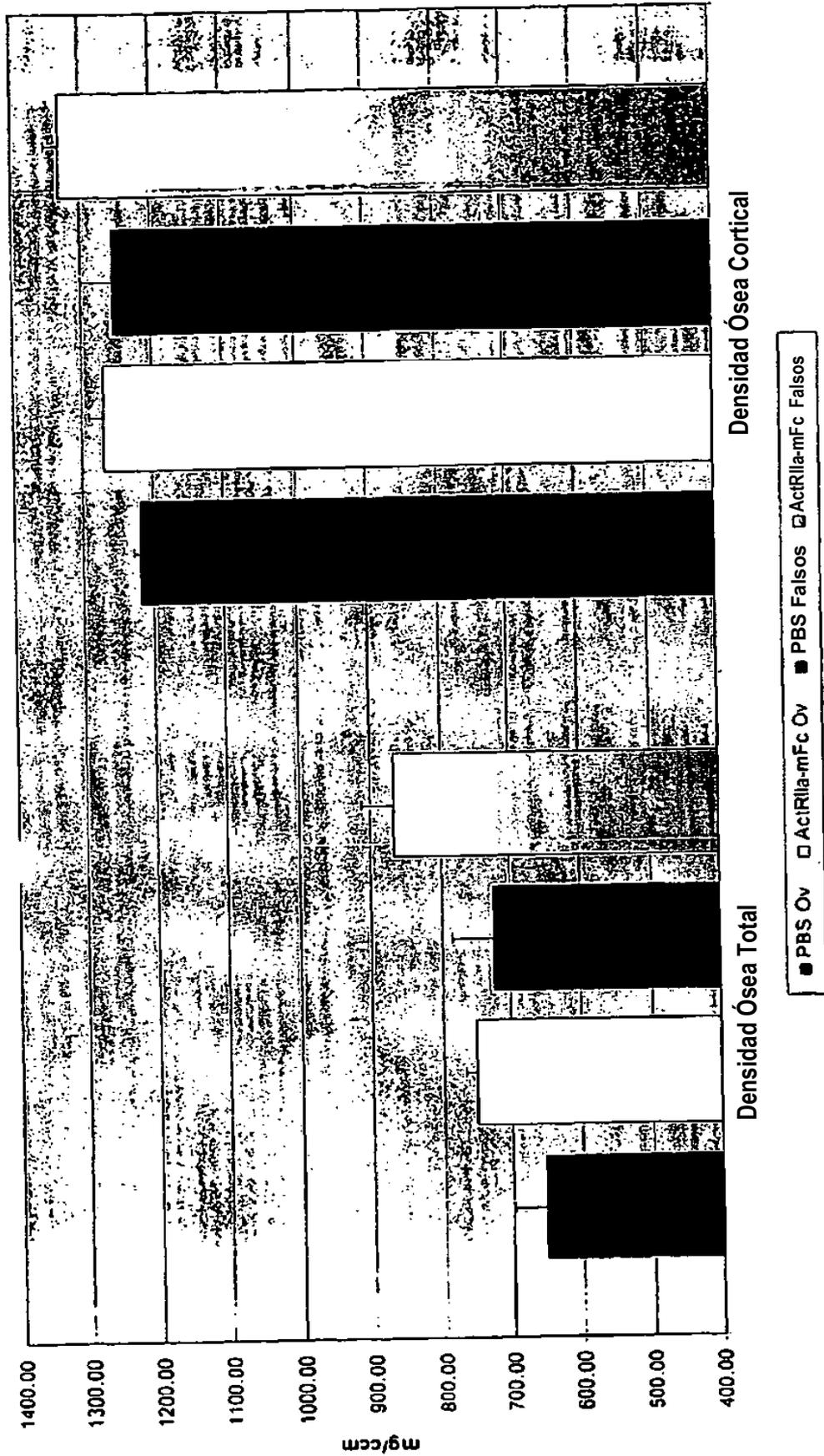


Figura 15

Contenido Óseo Diafisariode los Fémures

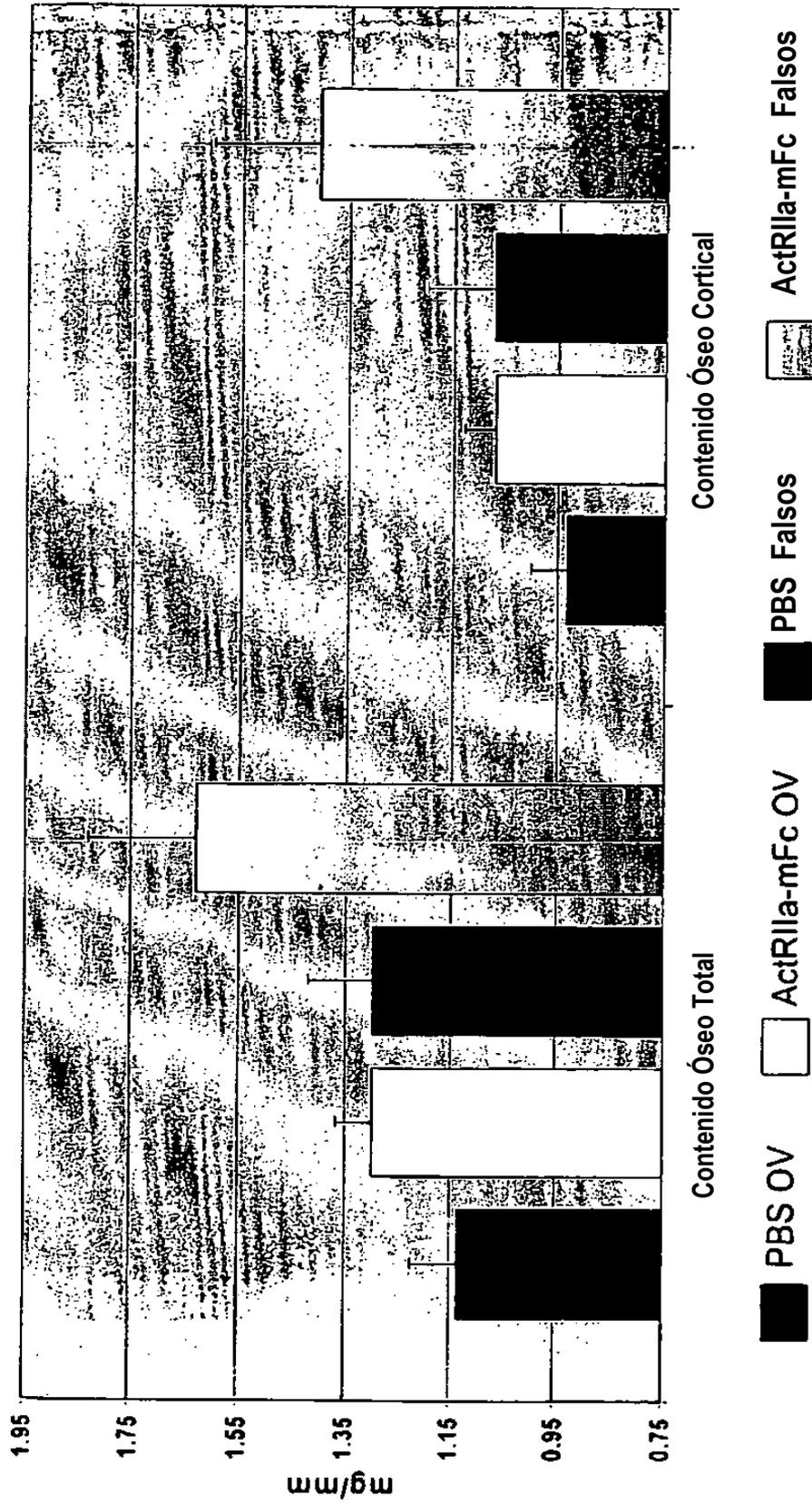


Figura 16

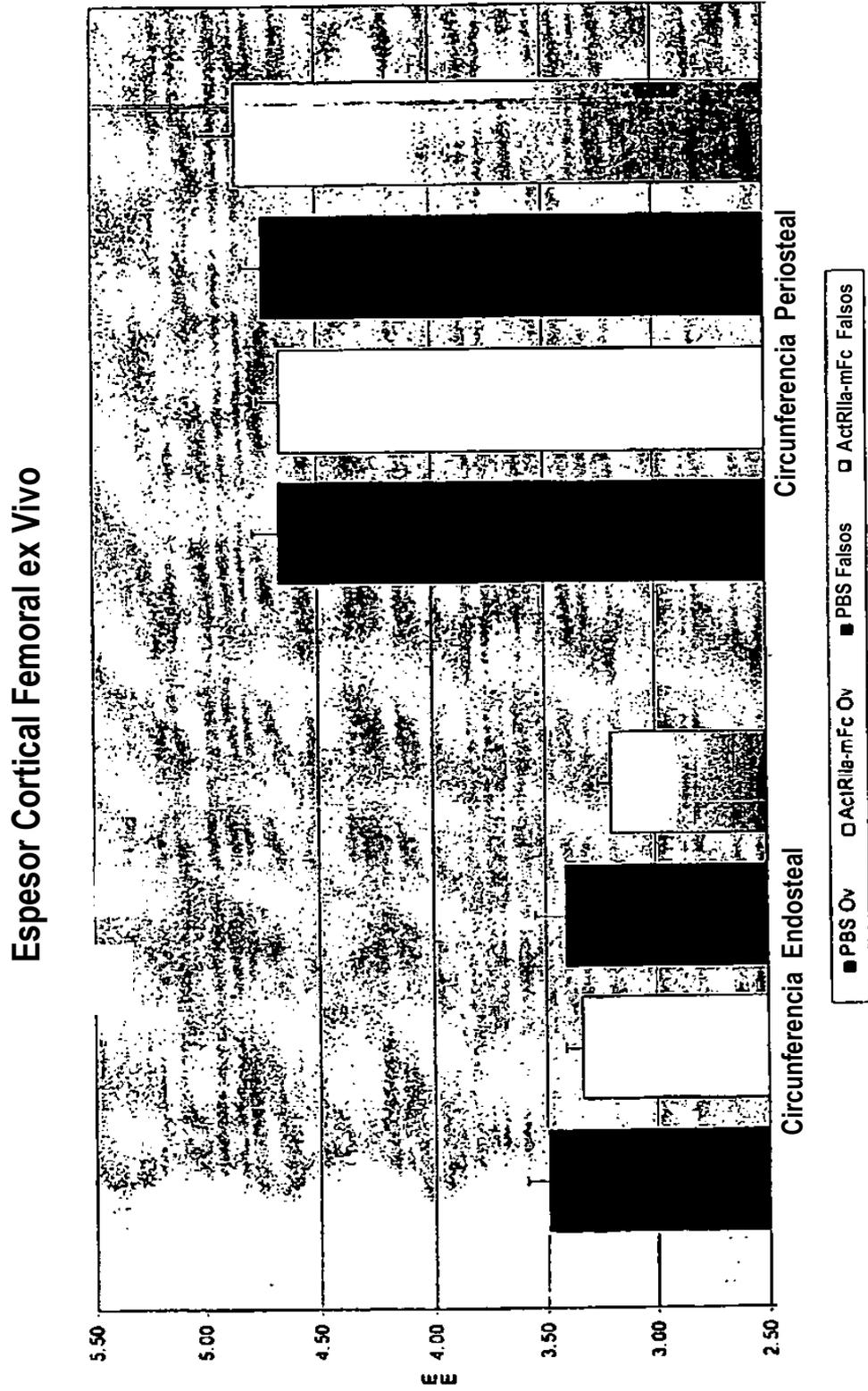


Figura 17

Test Biomecánico de Cuatro Puntos

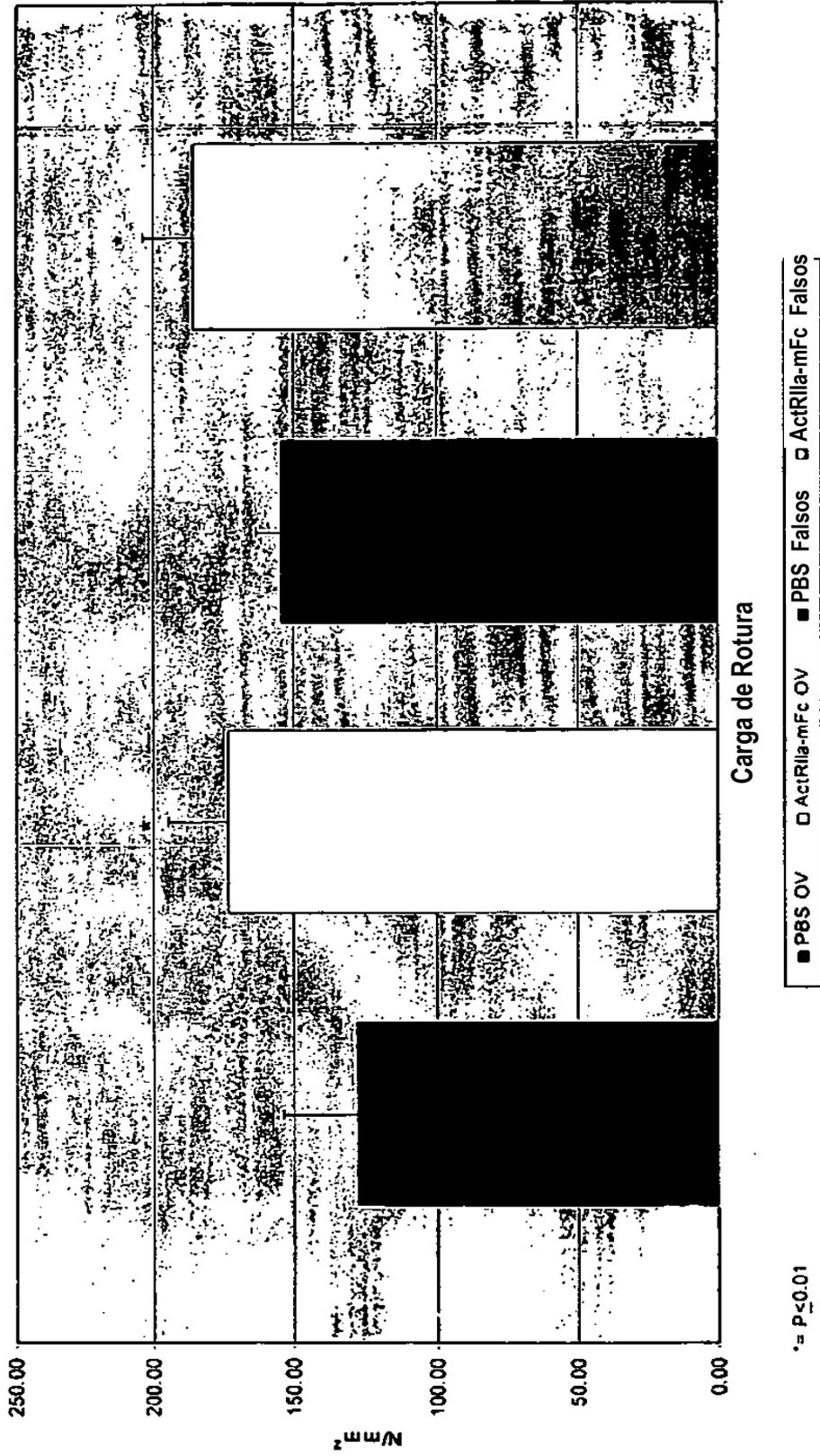
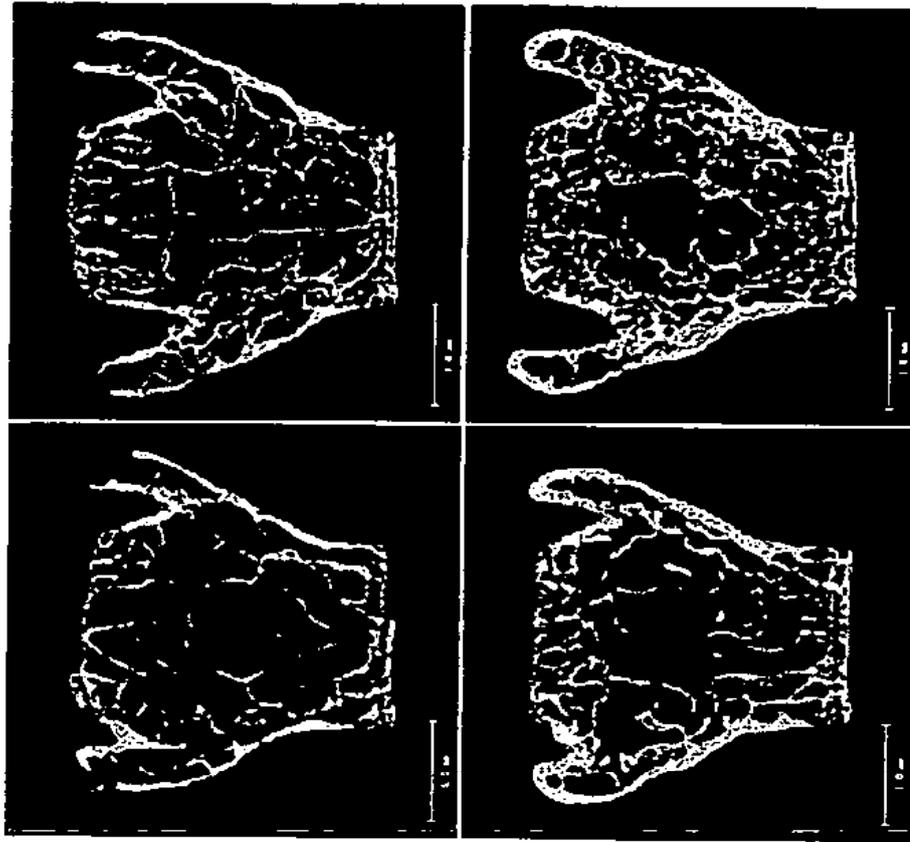


Figura 18



Datos de microCT mostrados al final del estudio
(edad 24 semanas)

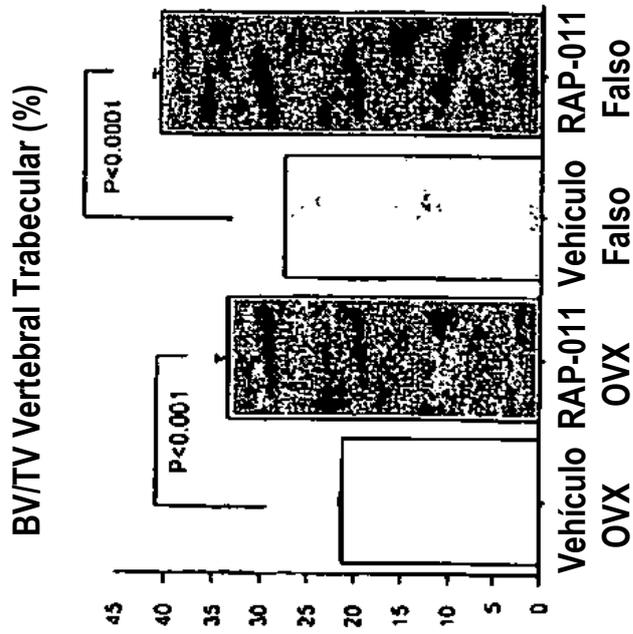
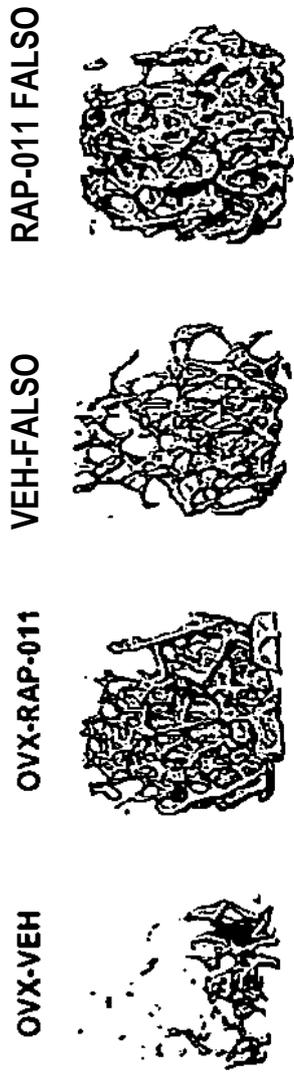


Figura 19



@ 12 semanas	OVX-VEH	OVX-RAP-011	VEH-FALSO	RAP-011 FALSO
Tb N (mm ⁻¹)	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.2 **	3.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2 **
Tb Sp (µm)	486.2 ± 79	283.9 ± 21 **	332.4 ± 25	230.2 ± 12 **
Con D (mm ⁻³)	8.4 ± 6	85.1 ± 13.7 **	41.4 ± 14.8	131.2 ± 16.5 **

** p < 0.01 vs VEH

Figura 20

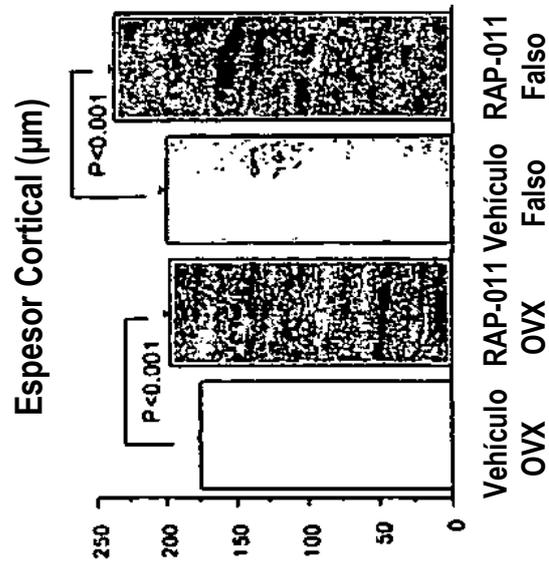
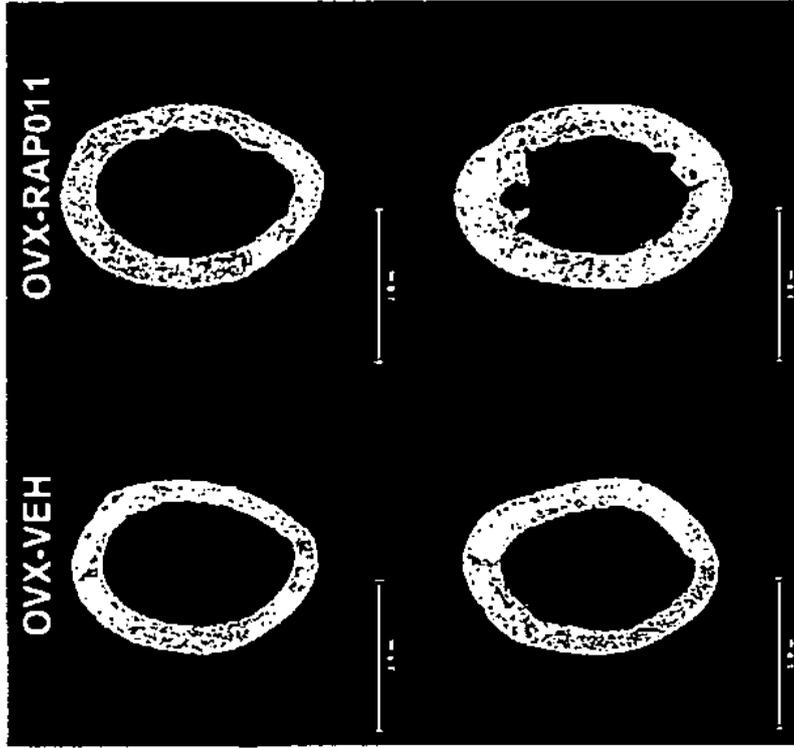
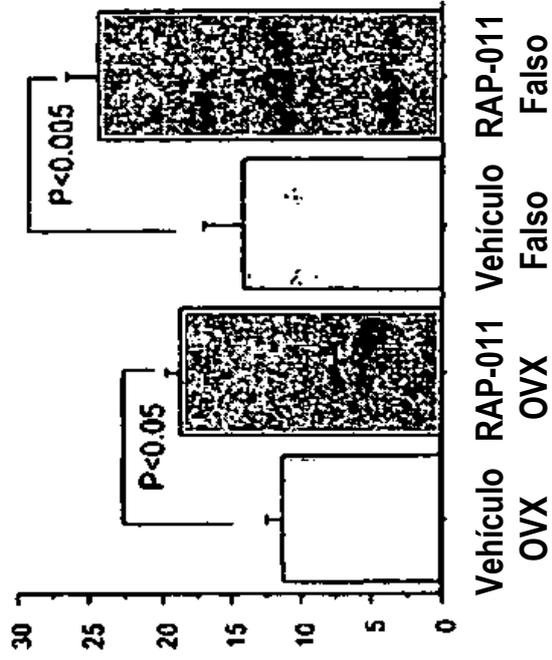


Figura 21

Energía Femoral hasta el Fallo (N · mm)



Energía Vertebral hasta el Fallo (N · mm)

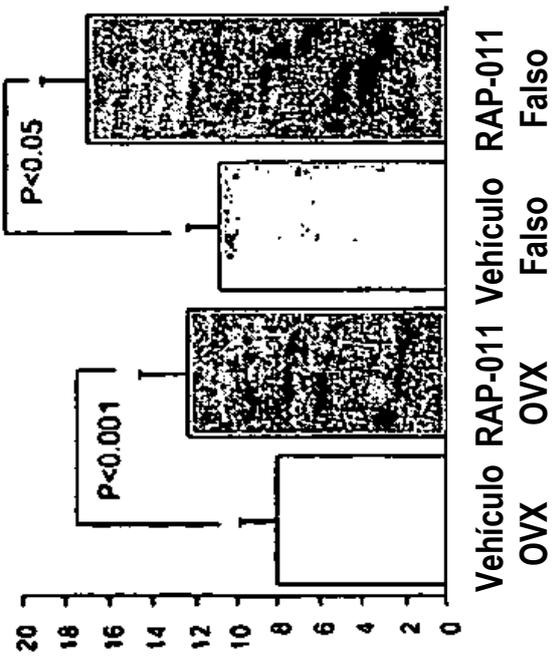


Figura 22

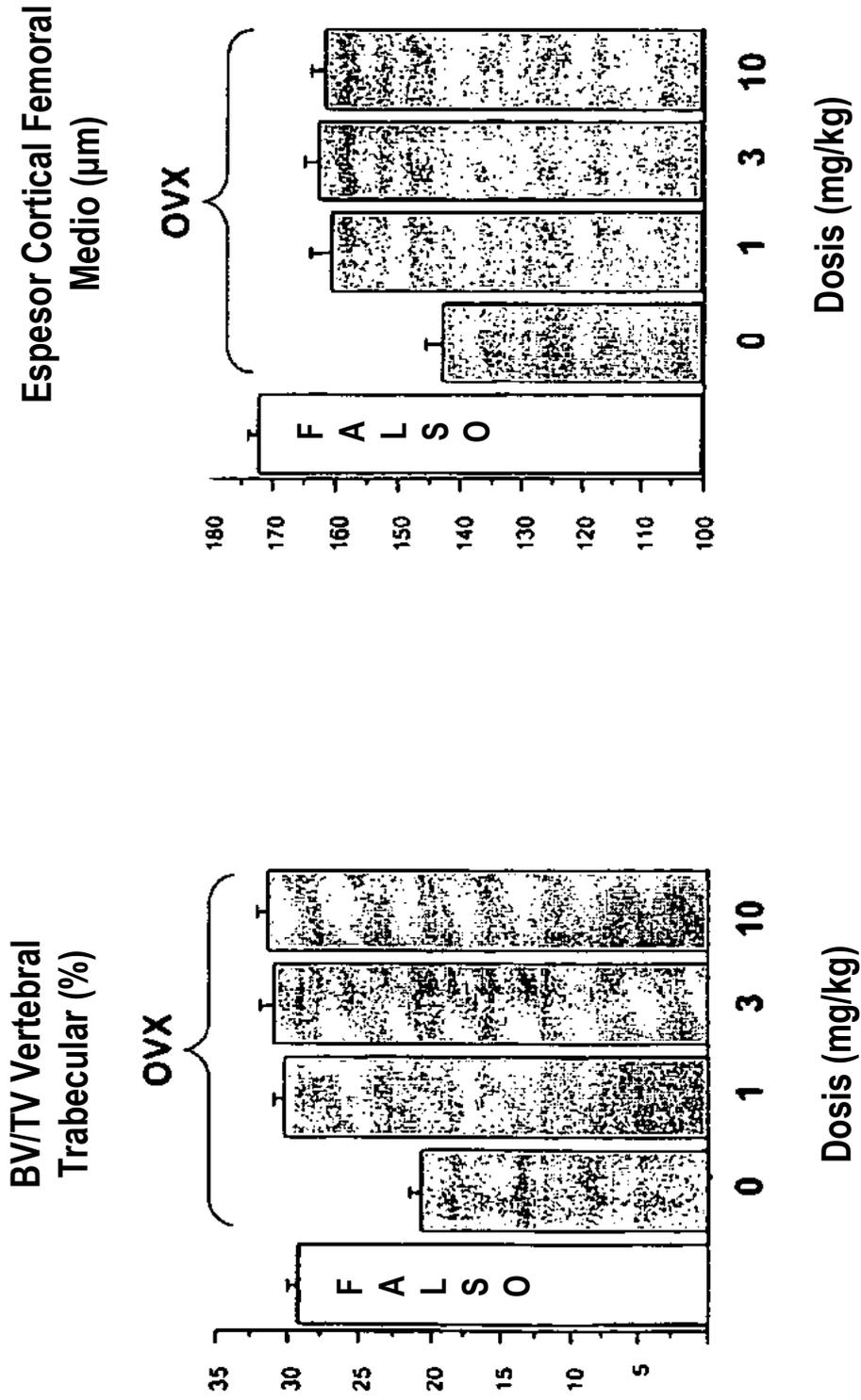


Figura 23

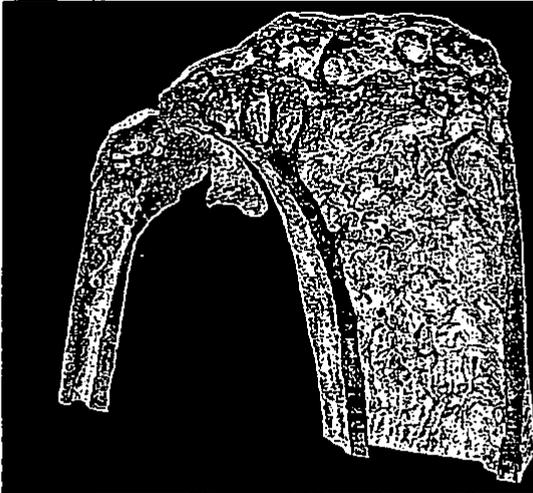
	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/Bs (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{día}$)	BFR/BSd ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{día}$)
PBS medio	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011 medio	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
Valor P	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

Figura 24

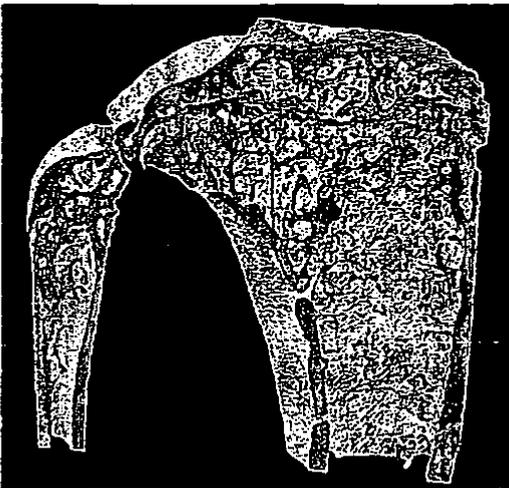
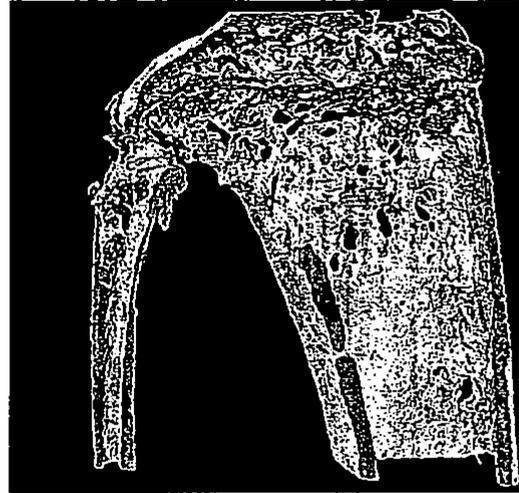
Parámetro	VEH-2 semanas (N = 6)	AP-011,2 semanas (N = 6)	VEH-4 semanas (N = 6)	RAP-011,4 semanas (N = 6)	VEH-6 semanas (N = 6)	RAP-011,6 semanas (N = 8)	VEH-12 semanas (N = 6)	RAP-011,12 semanas (N = 6)
Volumen de Hueso (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.45*	7.04 ± 0.51	15.57 ± 1.39*	6.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53*	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08*
Superficie osteoidea, (OS/BS), %	4.86 ± 0.34	5.32 ± 0.49	3.95 ± 0.51	3.65 ± 0.36	3.26 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
Superficie erosionada (ES/BS), %	17.36 ± 0.99	13.93 ± 0.96*	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.38 ± 1.31	11.89 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Número de osteoblastos/área (Ob/Tar) no./mm	429.89 ± 25.33	455.31 ± 28.29	411.84 ± 44.61	567.78 ± 53.13*	405.22 ± 24.2	634.61 ± 35.39*	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77*
Superficie de osteoblastos/superficie ósea Obs/BS), %	36.12 ± 2.42	29.43 ± 1.52*	33.5 ± 2.53	29.14 ± 1.93	35.5 ± 1.27	35.92 ± 1.29	28.45 ± 1.32	30.24 ± 1.6
Osteoblastos en el perímetro óseo, Nob/BPm), %	49.33 ± 2.52	40.89 ± 1.46*	48.52 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.26	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53
Número de osteoclastos/área (Oc/Tar) no./mm	65.81 ± 4.97	59.62 ± 5.89	51.42 ± 3.58	65.68 ± 8.18	45.23 ± 3.98	62.95 ± 5.18*	28.07 ± 1.85	61.15 ± 1.87*
Osteoclastos en el perímetro óseo, Noc/BPm), %	7.56 ± 0.53	5.34 ± 0.45*	8.26 ± 0.66	4.78 ± 0.59	5.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
Superficie de osteoblastos/superficie ósea Ocs/BS), %	8.76 ± 0.78	6.23 ± 0.5*	6.86 ± 0.67	5.36 ± 0.62	6.38 ± 0.67	5.8 ± 0.46	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Espesor trabecular (TbTh), ~m	13.59 ± 1.48	15.42 ± 0.45*	13.11 ± 0.46	17.68 ± 0.75*	12.04 ± 0.5	17.28 ± 0.35*	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02*
Separación trabecular (TbSp), ~m	167.74 ± 6.88	127.57 ± 7.25*	175.98 ± 9.3	98.81 ± 6.95*	187 ± 7.13	104.26 ± 3.42*	251.79 ± 18.14	98.07 ± 4.27*
Número trabecular (TbN), no./mm	5.55 ± 0.19	7.09 ± 0.36*	5.34 ± 0.23	8.73 ± 0.5*	5.07 ± 0.18	8.27 ± 0.22*	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29*
Superficie de mineralización (MS/BS), %	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73*	4.45 ± 1.02	8.84 ± 0.77*	3.6 ± 0.56	7.97 ± 0.73*	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51*
Velocidad de aposición mineral (mm/día)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.028*	0.566 ± 0.042	0.642 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.602 ± 0.016*	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013*
Velocidad de formación de hueso (~m ³ ·µm ² /día)	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.008*	0.025 ± 0.008	0.057 ± 0.005*	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004*	0.016 ± 0.002	0.035 ± 0.002*

Figura 25

Naif



5T2 (Tumor)



5T2 + RAP011

Figura 26

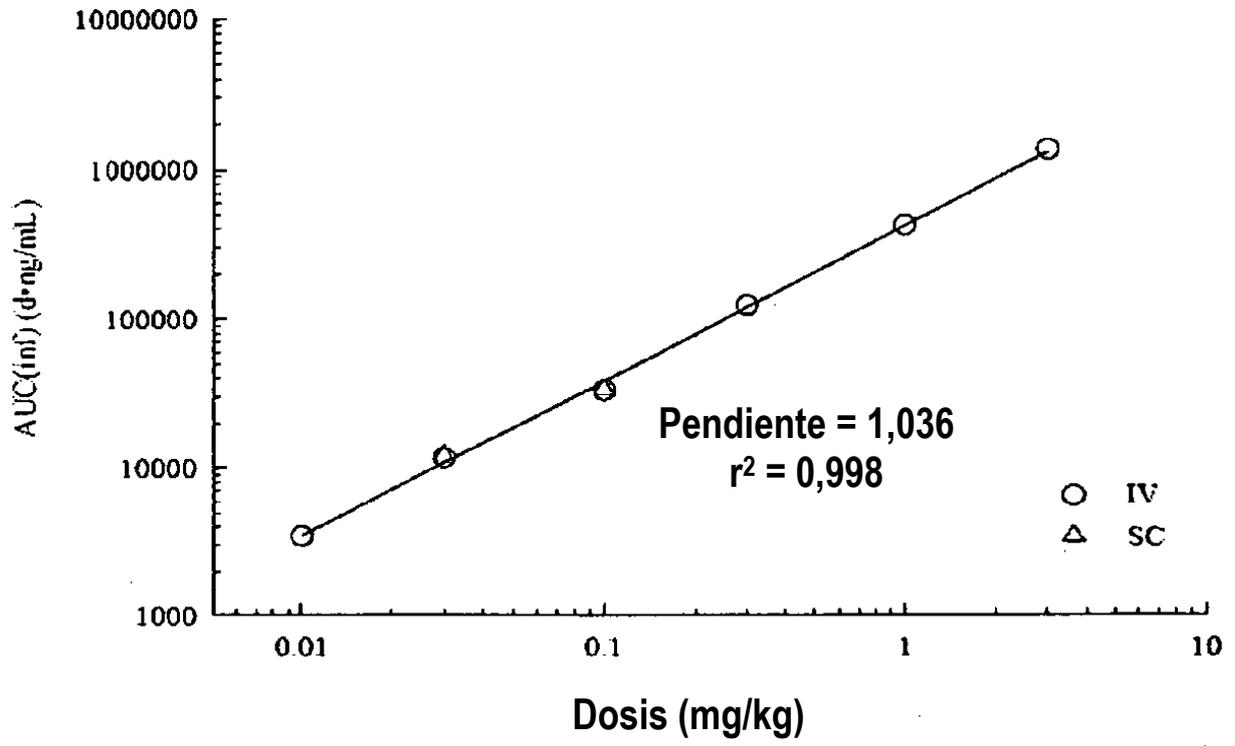


Figura 27

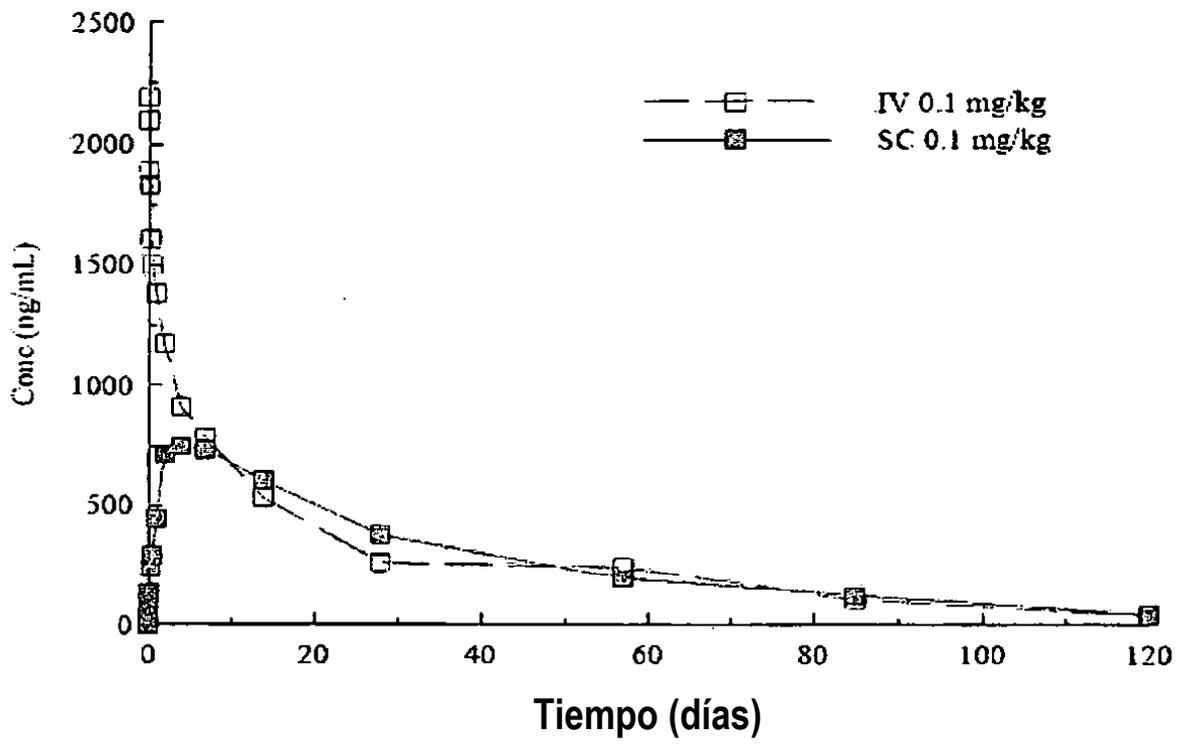


Figura 28

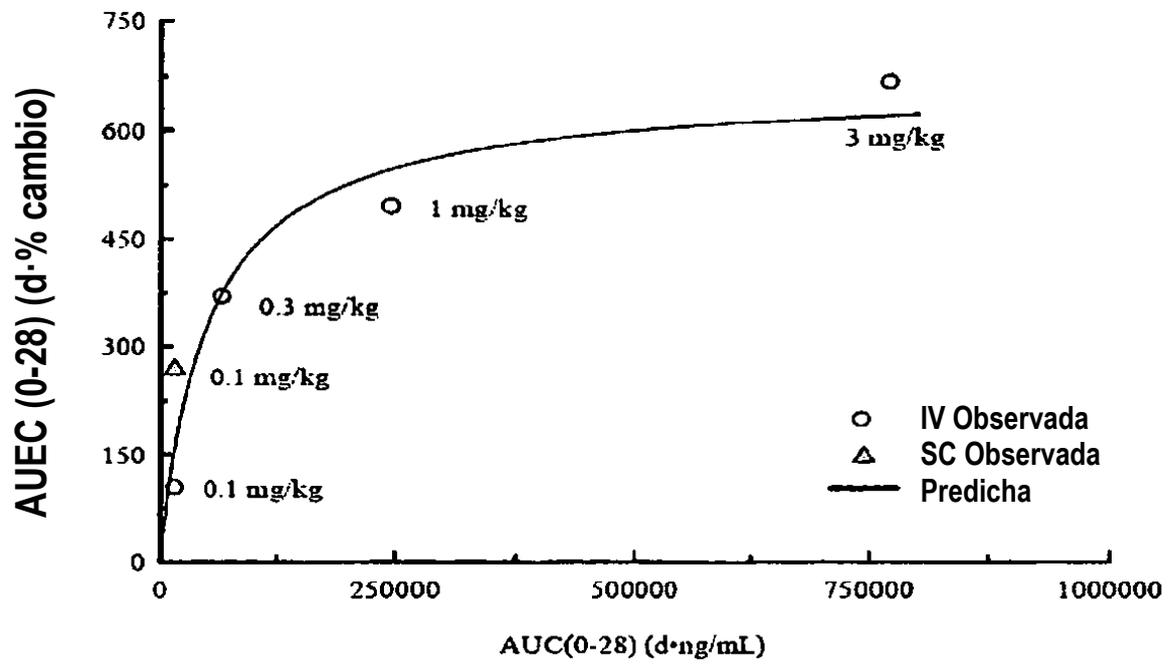


Figura 29

BMD Total (P1XI)

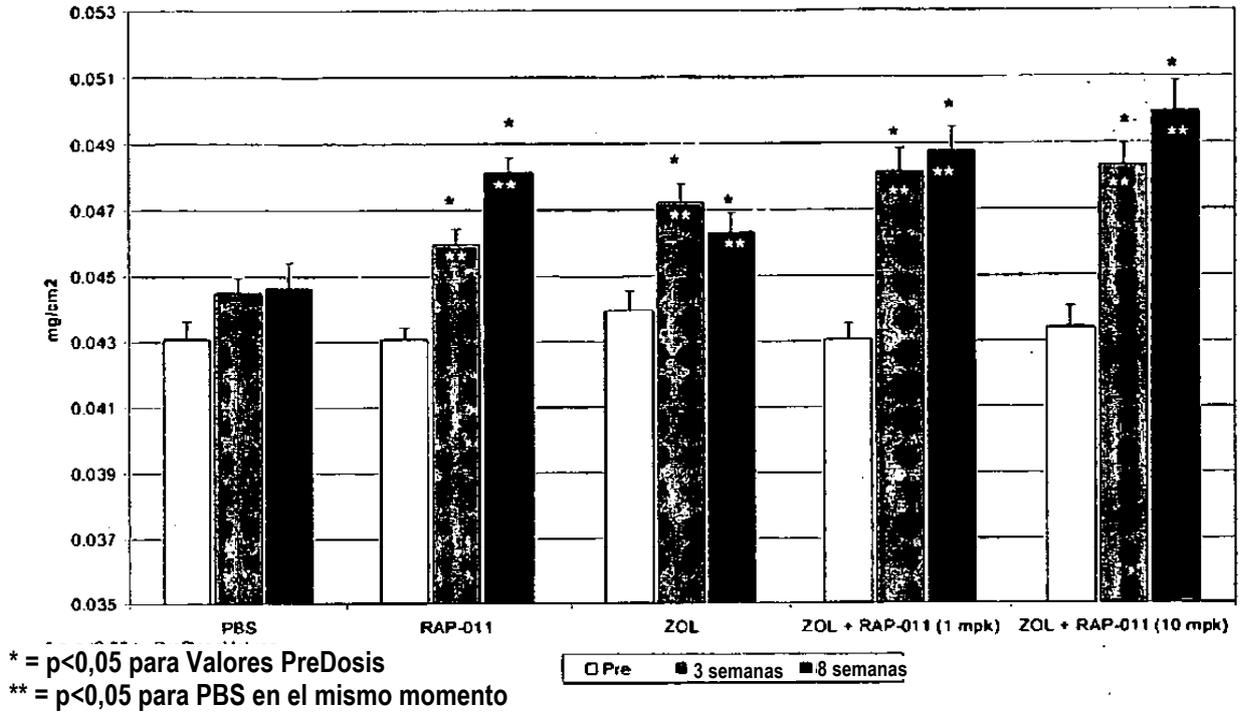


Figura 30