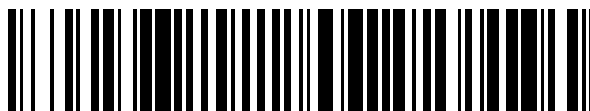


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 805**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2006** **E 06838343 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013** **EP 1973559**

54 Título: **Antagonistas de activina-ActRlla y usos para promover el crecimiento óseo**

30 Prioridad:

23.11.2005 US 739462 P

17.03.2006 US 783322 P

15.09.2006 US 844855 P

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

24.04.2013

73 Titular/es:

ACCELERON PHARMA INC. (100.0%)

128 Sidney Street

CAMBRIDGE MA 02139, US

72 Inventor/es:

KNOPF, JOHN y

SEEHRA, JASBIR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 401 805 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de activina-ActRIIa y usos para promover el crecimiento óseo

5 Antecedentes de la invención

Los trastornos óseos, que abarcan desde osteoporosis hasta fracturas, representan una serie de estados patológicos para los cuales existen pocos agentes farmacéuticos eficaces. En lugar de ello, el tratamiento se enfoca en intervenciones físicas y conductuales, que incluyen inmovilización, ejercicio y cambios de dieta. Sería beneficioso contar con agentes terapéuticos que promovieran el crecimiento óseo y el aumento de la densidad ósea con el propósito de tratar diversos trastornos óseos.

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

Las fracturas y otras alteraciones estructurales del hueso cicatrizan a través de un proceso que, al menos superficialmente, se asemeja a la secuencia de los sucesos del desarrollo de la osteogénesis, que incluyen la formación de tejido cartilaginoso y la mineralización subsiguiente. El proceso de cicatrización de la fractura se puede producir de dos maneras. La cicatrización ósea directa o primaria ocurre sin formación de callo. La cicatrización ósea indirecta o secundaria se produce con una etapa precursora de callo. La cicatrización primaria de fracturas implica que se vuelva a formar la continuidad mecánica a través de una ruptura localizada en una zona. En condiciones adecuadas, los osteoclastos que rodean la ruptura muestran una respuesta resortiva con tunelización y establecen vías para la penetración de los vasos sanguíneos y la cicatrización posterior. La cicatrización secundaria de los huesos sigue un proceso de inflamación, formación de un callo blando, mineralización del callo y remodelación del callo. En la etapa de inflamación, se producen un hematoma y una hemorragia como consecuencia de la ruptura de los vasos sanguíneos periósticos y endósticos en el sitio de la lesión. Las células inflamatorias invaden la zona. En la etapa de formación del callo blando, las células producen nuevos vasos, fibroblastos, material intracelular y células de soporte, que forman tejido de granulación en el espacio entre los fragmentos de la fractura. La unión clínica a través de la ruptura es establecida por tejido fibroso o cartilaginoso (callo blando). Se forman osteoblastos que actúan de mediadores en la mineralización del callo blando, que después es reemplazado por hueso laminar y sometido a los procesos de remodelación normales.

Además de las fracturas y otras rupturas físicas de la estructura del hueso, la pérdida del contenido mineral del hueso y de la masa ósea puede ser causada por una amplia variedad de condiciones y puede ocasionar problemas médicos importantes. Los cambios en la masa ósea ocurren de manera relativamente predecible a lo largo de la vida de un individuo. Hasta alrededor de los 30 años de edad, los huesos de los hombres y las mujeres crecen hasta su máxima masa a través del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondral y crecimiento radial. Después de aproximadamente los 30 años (para el hueso trabecular, por ejemplo, los huesos planos como las vértebras y la pelvis) y los 40 años (para el hueso cortical, por ejemplo, los huesos largos de las extremidades), se produce una pérdida lenta de masa ósea en los hombres y las mujeres. En las mujeres, se produce además una fase final de pérdida importante de hueso, probablemente debido a deficiencias de estrógeno posmenopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y 25% del compartimiento trabecular. Que la pérdida progresiva de hueso dé como resultado una enfermedad como la osteoporosis depende en gran parte de la masa ósea inicial del individuo y de si existen condiciones exacerbantes.

La pérdida ósea se caracteriza a veces como un desequilibrio en el proceso de remodelación normal del hueso. El hueso sano está constantemente sujeto a remodelación. La remodelación comienza con la resorción ósea por los osteoclastos. El hueso resorbido es reemplazado después por tejido óseo nuevo, que se caracteriza por formación de colágeno por los osteoblastos, y la calcificación subsiguiente. En los individuos sanos, las tasas de resorción y formación están equilibradas. La osteoporosis es una afección progresiva crónica, marcada por un desplazamiento del equilibrio hacia la resorción, que da como resultado una disminución general en la masa ósea y la mineralización ósea. La osteoporosis en los seres humanos es precedida por la osteopenia clínica (densidad mineral ósea 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 corren el riesgo de sufrir osteoporosis.

Por lo tanto, los métodos para controlar el equilibrio entre la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos pueden ser útiles para promover la cicatrización de las fracturas y otras lesiones de los huesos, así como para el tratamiento de trastornos como la osteoporosis, asociados a la pérdida de masa ósea y de la mineralización ósea.

Con respecto a la osteoporosis, el estrógeno, la calcitonina, la osteocalcina con vitamina K, o altas dosis de calcio en la dieta todos se utilizan como intervenciones terapéuticas. Otros enfoques terapéuticos para la osteoporosis incluyen los bisfosfonatos, la hormona paratiroidea, los calcimiméticos, las estatinas, los esteroides anabólicos, las sales de lantano y estroncio, y el fluoruro de sodio. Sin embargo, dichos agentes terapéuticos, a menudo están asociados a efectos secundarios indeseables.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente divulgación el proporcionar composiciones y métodos para promover el crecimiento y la mineralización de los huesos.

Resumen de la invención

En parte, la divulgación demuestra que las moléculas que tienen actividad antagonista de activina o ActRIIa ("antagonistas de activina" y "antagonistas de ActRIIa ") se pueden utilizar para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento óseo y/o aumentar la resistencia ósea. En particular, la divulgación demuestra que una forma soluble de ActRIIa actúa como un inhibidor de la señalización de activina-ActRIIa y promueve el aumento de la densidad ósea, del crecimiento óseo y de la resistencia ósea in vivo. Si bien la mayoría de los agentes farmacéuticos que promueven el crecimiento óseo o inhiben la pérdida ósea actúan como agentes anticatabólicos (a los que también se hace referencia comúnmente como "agentes catabólicos") (p. ej., bisfosfonatos) o agentes anabólicos (p. ej., hormona paratiroidea, PTH, cuando se dosifican adecuadamente), la proteína ActRIIa soluble exhibe actividad dual, tiene a la vez efectos catabólicos y anabólicos. Por lo tanto, la divulgación establece que los antagonistas de la vía de señalización de activina-ActRIIa se pueden utilizar para aumentar la densidad ósea y promover el crecimiento óseo. Si bien la ActRIIa soluble puede afectar al hueso por un mecanismo distinto del antagonismo de activina, la divulgación demuestra no obstante que se pueden seleccionar agentes terapéuticos deseables basándose en la actividad antagonista de activina-ActRIIa. Por lo tanto, los antagonistas de activina-ActRIIa se pueden usar para tratar trastornos asociados a baja densidad ósea o baja resistencia ósea, como la osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes que lo necesitan, como en pacientes con una fractura de hueso. Además, el polipéptido ActRIIa soluble promueve el crecimiento óseo sin causar un aumento consecuentemente mensurable en la masa muscular.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido ActRIIa de unión a activina que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11).

El polipéptido del primer aspecto puede tener una secuencia de aminoácidos que comprenda SEC. ID N°: 7 o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 7. Los polipéptidos ActRIIa del primer aspecto se pueden formular como una preparación farmacéutica que contenga el polipéptido ActRIIa de unión a activina y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende SEC. ID N°: 7. Dicho polipéptido puede ser soluble y se puede unir a activina.

Preferentemente, los polipéptidos de unión a activina de la invención se unen a la activina con una K_D menor de 1 micromolar o menor de 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, los polipéptidos ActRIIa de unión a activina se unen selectivamente a activina frente a GDF11 y/o GDF8 y preferentemente con una K_D que es al menos 10 veces, 20 veces o 50 veces menor con respecto a la activina que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Sin querer adherir a un mecanismo de acción particular, se espera que este grado de selectividad por la inhibición de activina con respecto a la inhibición de GDF11/GDF8 sea la razón de los efectos selectivos sobre el hueso sin un efecto consecuentemente medible sobre el músculo. En muchas realizaciones, se seleccionará un polipéptido ActRIIa para que cause menos de 15%, menos de 10% o menos de 5% de aumento en el músculo a las dosis que logran un efecto deseable sobre el hueso. Preferentemente el polipéptido es al menos 95% puro, con respecto a otros componentes polipeptídicos, según lo evaluado mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y más preferentemente, la composición es al menos 98% pura.

Un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble, puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión al ligando) con respecto al polipéptido ActRIIa de origen natural. Se encuentran ejemplos de polipéptidos ActRIIa alterados en WO 2006/012627, págs. 59-60. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, un insecto u otra célula eucariota, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIa de origen natural.

Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, como una etiqueta de epítopo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión con GST. Opcionalmente, un polipéptido de la invención incluye uno o más por residuos de aminoácidos modificados, seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica y un aminoácido conjugado a un agente de derivación orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno óseo. Preferentemente, la preparación farmacéutica es sustancialmente apirógena. En general, es preferible que una proteína ActRlla se exprese en una línea celular de mamíferos que medie adecuadamente la glucosilación natural de la proteína ActRlla para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han utilizado con éxito las líneas celulares humana y CHO, y se espera que otros sistemas de expresión de mamíferos comunes, sean útiles.

Como se describe en este documento, las proteínas ActRlla denominadas ActRlla-Fc (una forma con un ligador mínimo entre la porción ActRlla y la porción Fc) tienen propiedades deseables, que incluyen la unión selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11, gran afinidad de unión al ligando y vida media sérica mayor a dos semanas en los modelos animales. En ciertas realizaciones, la invención proporciona polipéptidos ActRlla-Fc y preparaciones farmacéuticas que contienen dichos polipéptidos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que contiene una secuencia codificante de un polipéptido ActRlla de unión a activina de la invención. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia codificante de un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión al ligando) de un ActRlla y una secuencia que codificaría parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRlla, pero para un codón de detención colocado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o colocado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede contener una secuencia del polinucleótido ActRlla completo como SEC. ID N°: 4 o 5, o una versión parcialmente truncada, donde dicho polinucleótido aislado comprende además un codón de terminación de la transcripción de al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o de lo contrario colocado de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada del ActRlla completo. Una secuencia de ácido nucleico preferida es SEC. ID N°: 14. Los polipéptidos de la invención se pueden unir operativamente a un promotor para la expresión, y la invención proporciona células transformadas con polinucleótidos recombinados de la invención. Preferentemente la célula es una célula de mamífero como una célula CHO o una célula humana que no es una célula madre embrionaria humana ni una célula germinal humana.

En ciertos aspectos, la invención proporciona métodos para preparar un polipéptido ActRlla de unión a activina que comprende: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRlla soluble, en donde dicha célula es transformada con un polipéptido recombinado de la invención; y b) recuperar el polipéptido ActRlla de unión a activina así expresado. Los polipéptidos ActRlla solubles se pueden recuperar como fracciones crudas, parcialmente purificadas o muy purificadas. La purificación se puede llevar a cabo mediante una serie de pasos de purificación, que incluyen, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q sefarosa), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico.

La invención también proporciona un polipéptido del primer aspecto para usar en la promoción del crecimiento óseo, el aumento de la densidad ósea y el aumento de la resistencia ósea.

La invención también proporciona un polipéptido del primer aspecto para usar en el tratamiento o la prevención de un trastorno relacionado con los huesos. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un polipéptido del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para prevenir un trastorno óseo. Los trastornos relacionados con los huesos pueden ser osteoporosis primaria o secundaria, osteoporosis posmenopáusica, pérdida ósea por hipogonadismo, pérdida ósea inducida por un tumor, pérdida ósea inducida por tratamiento contra el cáncer, metástasis óseas, mieloma múltiple y enfermedad de Paget. El trastorno relacionado con los huesos puede ser cáncer asociado a metástasis óseas, pérdida ósea asociada a un régimen de tratamiento contra el cáncer o cáncer asociado a pérdida ósea. El polipéptido puede tener una o más de las características siguientes i) se une a un ligando de ActRlla con una K_D de al menos 10^{-7} M; e ii) inhibe la señalización de ActRlla en una célula.

En otro aspecto, la invención proporciona una combinación que comprende (a) un polipéptido del primer aspecto y (b) un agente seleccionado del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un estrógeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos, una hormona paratiroidea, una calcitonina, un complemento de calcio y un complemento de vitamina D, para usar el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende (a) un polipéptido del primer aspecto y (b) un agente seleccionado del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un estrógeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos, una hormona paratiroidea, una calcitonina, un complemento de calcio y un

complemento de vitamina D.

En otro aspecto, la invención también proporciona un polipéptido del primer aspecto para usar en la promoción del crecimiento óseo y la inhibición de la resorción ósea en un paciente. En este aspecto, el polipéptido puede causar menos de 10% de aumento en la masa del músculo esquelético del paciente. El polipéptido puede estar destinado a ser administrado para que alcance una concentración sérica en el paciente de al menos 0.2 pg/kg, y pueda tener una vida media sérica entre 15 y 30 días. El polipéptido se puede administrar al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por semana o una vez por mes.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la purificación de ActRlla-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un pico único y bien definido.

La figura 2 muestra la unión de ActRlla-hFc a activina y GDF-11, medida por el ensayo BiaCore™.

La figura 3 muestra un esquema para el ensayo del gen reportero A-204. La figura muestra el vector reportero: pGL3 (CAGA)₁₂ (descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) El motivo CAGA₁₂ está presente en los genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores que señalizan a través de Smad 2 y 3.

La figura 4 muestra los efectos de ActRlla-hFc (rombos) y ActRlla-mFc (cuadrados) sobre la señalización de GDF-8 en el ensayo del gen reportero A-204. Ambas proteínas presentan una inhibición sustancial de la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares.

La figura 5 muestra los efectos de tres preparaciones diferentes de ActRlla-hFc sobre la señalización de GDF-11 en el ensayo del gen reportero A-204.

La figura 6 muestra ejemplos de imágenes DEXA de ratones BALB/c de control y tratados con ActRlla-mFc, antes (paneles superiores) y después (paneles inferiores) del período de tratamiento de 12 semanas. El sombreado más pálido indica mayor densidad ósea.

La figura 7 muestra una cuantificación de los efectos de ActRlla-mFc sobre la densidad mineral ósea en ratones BALB/c durante el período de 12 semanas. Los tratamientos fueron: control (rombos), dosis de 2 mg/kg de ActRlla-mFc (cuadrados), dosis de 6 mg/kg de ActRlla-mFc (triángulos) y dosis de 10 mg/kg de ActRlla-mFc (círculos).

La figura 8 muestra una cuantificación de los efectos de la ActRlla-mFc sobre el contenido mineral óseo en ratones BALB/c durante el período de 12 semanas. Los tratamientos fueron: control (rombos), dosis de 2 mg/kg de ActRlla-mFc (cuadrados), dosis de 6 mg/kg de ActRlla-mFc (triángulos) y dosis de 10 mg/kg de ActRlla-mFc (círculos).

La figura 9 muestra una cuantificación de los efectos de ActRlla-mFc sobre la densidad mineral ósea del hueso trabecular en ratonas C57BL6 ovariectomizadas (OVX) o falsamente operadas (SHAM) después de un período de seis semanas. Los tratamientos fueron: control (PBS) o dosis de 10 mg/kg de ActRlla-mFc (ActRlla).

La figura 10 muestra una cuantificación de los efectos de ActRlla-mFc sobre el hueso trabecular en ratonas C57BL6 ovariectomizadas (OVX) durante un período de 12 semanas. Los tratamientos fueron: control (PBS; barras pálidas) o dosis de 10 mg/kg de ActRlla-mFc (ActRlla; barras oscuras).

La figura 11 muestra una cuantificación de los efectos de ActRlla-mFc sobre el hueso trabecular en ratonas C57BL6 falsamente operadas después de un período de 6 o 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron: control (PBS; barras pálidas) o dosis de 10 mg/kg de ActRlla-mFc (ActRlla; barras oscuras).

La figura 12 muestra los resultados del análisis pQCT de la densidad ósea en ratonas ovariectomizadas durante 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron: control (PBS; barras pálidas) o ActRlla-mFc (barras oscuras). eje-y: mg/ccm

La figura 13 representa los resultados del análisis pQCT de densidad ósea en ratonas falsamente operadas durante 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron: control (PBS; barras pálidas) o ActRlla-mFc (barras oscuras). eje-y: mg/ccm

Las figuras 14A y 14B muestran un análisis DEXA de cuerpo entero 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.

La figura 15 muestra el análisis pQCT ex vivo de la diáfisis media femoral después de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron: control con vehículo (PBS, barras oscuras) y ActRlla-mFc (barras pálidas).

Las cuatro barras hacia la izquierda muestran la densidad ósea total mientras que las cuatro barras a la derecha muestran la densidad ósea cortical. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representa los datos de las ratonas ovariectomizadas mientras que el segundo par de barras representa los datos de las ratonas falsamente operadas.

La figura 16 muestra el análisis pQCT ex vivo del contenido óseo diafisario de la diáfisis media femoral después de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron: control con vehículo (PBS, barras oscuras) y ActRlla-mFc (barras pálidas). Las cuatro barras hacia la izquierda muestran el contenido óseo total mientras que las cuatro barras a la derecha muestran el contenido óseo cortical. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representa los datos de las ratonas ovariectomizadas mientras que el segundo par de barras representa los datos de las ratonas falsamente operadas.

La figura 17 muestra el análisis pQCT ex vivo de la diáfisis media femoral y el espesor femoral cortical. Los

tratamientos fueron: control con vehículo (PBS, barras oscuras) y ActRIIa-mFc (barras pálidas). Las cuatro barras a la izquierda muestran la circunferencia endóstica mientras que las cuatro barras a la derecha muestran la circunferencia perióstica. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representa los datos de las ratonas ovariectomizadas mientras que el segundo par de barras representa los datos de las ratonas falsamente operadas.

La figura 18 representa los resultados de pruebas mecánicas de fémures después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron: control con vehículo (PBS, barras oscuras) y ActRIIa-mFc (barras pálidas). Las dos barras a la izquierda representan los datos de las ratonas ovariectomizadas mientras que las dos últimas barras representan los datos de las ratonas falsamente operadas.

La figura 19 muestra los efectos de ActRIIa-mFc sobre el volumen del hueso trabecular.

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

La figura 21 muestra los efectos de ActRIIa-mFc sobre el hueso cortical.

La figura 22 muestra los efectos de ActRIIa-mFc sobre la resistencia mecánica del hueso.

La figura 23 muestra los efectos de diferentes dosis de ActRIIa-mFc sobre características del hueso a tres dosis diferentes.

La figura 24 muestra la histomorfometría ósea que indica que ActRIIa-mFc tiene doble actividad anabólica y anti-resortiva.

Descripción detallada de la invención

1. Visión general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene diversos factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que esas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como en invertebrados. Los integrantes de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y la especificación del tejido y pueden influir sobre diversos procesos de diferenciación, incluidos adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos integrantes tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Manipulando la actividad de un integrante de la familia de TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piomontés y belga azul tienen una mutación de pérdida de la función en el gen GDF8 (también denominada miostatina) que provoca un marcado aumento de la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en humanos los alelos inactivos de GDF8 se asocian a mayor masa muscular y según se dice, una fortaleza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos, que pertenecen a la superfamilia de 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 también codifica una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado. En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción hormonal en células ováricas y placentarias, sustentar la supervivencia celular neuronal, influir positiva o negativamente en el progreso del ciclo celular dependiendo del tipo de célula e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios (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, el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de células de leucemia monocítica humana estimuladas resultó ser idéntico a activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A actúa como un regulador positivo, natural, de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) desde la hipófisis, la activina promueve la secreción y la síntesis de FSH, mientras la inhibina evita la secreción y la síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada a folistatina (FSRP), la α_2 -macroglobulina, cerberus y endoglin.

Las señales de TGF- β son mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina-treonina quinasa tipo I y tipo II, los cuales fosforilan y activan en dirección 3' las proteínas Smad en el momento de la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad prevista serina/treonina. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores tipo II son necesarios para unir ligandos y para la expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina tipos I y II forman un complejo estable luego de la unión del ligando, que da lugar a la fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

Se identificaron dos receptores tipo II relacionados, ActRIIa y ActRIIb, como los receptores tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIa y

ActRIIb pueden interaccionar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , incluidas BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 es el principal receptor tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como receptor para las activinas, particularmente para la activina B.

Como se demostró en este documento, un polipéptido ActRIIa soluble (sActRIIa), que muestra una preferencia sustancial por unirse a la activina A a diferencia de otros integrantes de la familia de TGF-beta, como GDF8 o GDF11, es eficaz para promover el crecimiento óseo y el aumento de la densidad ósea *in vivo*. Sin desear adherir a ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de sActRIIa sea causado principalmente por un efecto antagonista de la activina, dada la muy fuerte unión a la activina (constante de disociación picomolar) exhibida por el constructo sActRIIa particular utilizado en estos estudios. Independientemente del mecanismo, resulta evidente a partir de los datos presentados en este documento que los antagonistas de ActRIIa-activina aumentan realmente la densidad ósea en los ratones normales y en los modelos de ratón para osteoporosis. Debe señalarse que el hueso es un tejido dinámico, con crecimiento o contracción y aumento o disminución de la densidad 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 de los huesos se pueden incrementar aumentando los factores productivos, disminuyendo los factores destructivos, o llevando a cabo ambas acciones. Las expresiones "promover el crecimiento óseo" y "aumentar la mineralización ósea" se refieren a cambios físicos observables en el hueso y pretenden ser neutras en cuanto al mecanismo por el cual se producen esos cambios.

Los modelos de ratón para osteoporosis y crecimiento óseo/aumento de la densidad ósea que se utilizaron en los estudios descritos en este documento se consideran como muy predictivos de la eficacia en humanos, y por consiguiente, esta divulgación proporciona métodos para usar los polipéptidos ActRIIa y otros antagonistas de activina-ActRIIa para promover el crecimiento óseo y el aumento de la densidad ósea en humanos. Los antagonistas de activina-ActRIIa incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles, anticuerpos que se unen a la activina (particularmente las subunidades A o B de activina, a las que se hace referencia también como β A o β B) y que rompen la unión de ActRIIa, anticuerpos que se unen a ActRIIa y rompen la unión de activina, proteínas que no son anticuerpos seleccionadas para unirse a activina o a ActRIIa (véase, p. ej., WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US 2003/0133939 y US 2005/0238646 por ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y la selección de los mismos), péptidos aleatorizados seleccionados para unirse a activina o ActRIIa, a menudo unidos a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otras porciones) con actividad de unión a activina o ActRIIa, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión tipo I (por ejemplo, un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir entre sí para crear una molécula de unión bifuncional. Aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización de activina-ActRIIa. Diversas proteínas tienen actividad antagonista de activina-ActRIIa, incluida la inhibina (es decir, la subunidad alfa de inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente a la activina en todos los tejidos, follistatina (p. ej., follistatina-288 y follistatina-315), cerberus, FSRP, endogлина, activina C, alfa (2)-macroglobulina y un mutante de activina A, M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). En general, formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión del receptor tipo I se pueden unir a receptores tipo II y no pueden formar un complejo ternario activo, actuando por lo tanto como antagonistas. Además se pueden usar ácidos nucleicos, como moléculas antisentido, ARNip o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, particularmente, la expresión de ActRIIa, como antagonistas de activina-ActRIIa. Preferentemente, el antagonista de activina-ActRIIa para usar tendrá selectividad por inhibir la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia de TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11. Las proteínas ActRIIb solubles se unen realmente a activina; sin embargo, la proteína de tipo silvestre no exhibe una selectividad importante en la unión 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. Sin embargo, se han identificado formas alteradas de ActRIIb con propiedades de unión diferentes (véase, por ejemplo, WO 2006/012627, pp. 55-59) y estas proteínas pueden lograr los efectos deseados en el hueso. A ActRIIb nativa o alterada se le puede dar especificidad adicional para activina por acoplamiento con un segundo agente de unión selectivo para activina.

Los términos utilizados en esta especificación tienen en general los significados corrientes en el área, en el contexto de esta invención y en el contexto específico en el que cada término es utilizado. Algunos términos se discuten a continuación o en otra parte de la especificación, para proporcionar orientación adicional a quien la practique al describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo prepararlas y utilizarlas. El alcance o el significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en que se utiliza el término.

"Alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las medidas. Habitualmente, los grados de error de ejemplo suelen estar dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10% y más preferentemente dentro del 5% de un determinado

valor o rango de valores.

Alternativamente y, en particular en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente en un entorno de 5 veces y más preferentemente en un entorno de 2 veces un determinado valor. Las cantidades numéricas presentadas en este documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que se puede inferir el término "alrededor de" o "aproximadamente" cuando no haya sido indicado expresamente.

Los métodos de la invención pueden incluir pasos de comparación de secuencias entre sí, que incluyen la secuencia de tipo silvestre con uno o varios mutantes (variantes). Dichas comparaciones comprenden habitualmente alineamientos de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas y/o algoritmos de alineamiento de secuencias que son bien conocidos en el área (como BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, cuando una mutación contiene una inserción o delección de un residuo, la alineación de secuencias introducirá un "hueco" (gap) (normalmente representado por un guión, o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

"Homólogas", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común," incluidas las proteínas de las superfamilias de la misma especie de organismos, así como las proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Dichas proteínas (y los ácidos nucleicos que las codifican) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

La expresión "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, alude al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

Sin embargo, en el uso común y en esta solicitud, el término "homólogas", cuando es modificado con un adverbio, como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia, y puede estar relacionado o no, con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos ActRIIa

En este documento se dan a conocer polipéptidos ActRIIa. Según se usa en este documento, el término "ActRIIa" se refiere a proteínas de una familia de receptores de activina tipo IIa (ActRIIa) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIa por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIa en este documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas identificadas en la actualidad. Los integrantes de la familia de ActRIIa son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad prevista de serina/treonina quinasa.

La expresión "polipéptido ActRIIa" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un integrante de la familia ActRIIa, así como cualquiera de sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conserven una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIa incluye los polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIa conocido que tenga una secuencia por lo menos 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIa y preferentemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más de identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa se puede unir a, e inhibir la función de una proteína ActRIIa y/o activina. Preferentemente, un polipéptido ActRIIa promueve el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIa incluyen el polipéptido precursor de ActRIIa humano (SEC. ID N°: 1) y los polipéptidos ActRIIa solubles humanos (p. ej., SEQ ID N°: 2, 3, 7 y 12).

La secuencia de la proteína precursora de ActRIIa humana es la siguiente:

MGAAAKLAFAVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTN
QTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCY
DRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTQPTSNP
VTPKPPYYNILLYSIVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVL
VPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEY
VAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRSTS
VDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNECHIAETMARGLA
YLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGLA
LKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDM
YAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEIIGQHPSLEDMQE
VVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAG
CVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVMTNVDFPPKESL
 (SEQ ID NO: 1)

El péptido señal esta subrayado simple; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de N-glucosilación están subrayados doble.

5

La secuencia del polipéptido procesado ActRlla soluble humano (extracelular), es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT
WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCE
GNMCNEKFSYFPMEVQTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

10 El extremo C-terminal "cola" del dominio extracelular está subrayado. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT
WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCE
GNMCNEKFSYFP (SEQ ID NO:3)

15 La secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRlla humana es la siguiente (nucleótidos 164-1705 de la entrada de Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTT
 CAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTCTTTAATGC
 TAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGGT
 GACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTT
 CCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATCAACTGCTATGA
 CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGTC
 TGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAG
 TCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCTATTACAACAT
 CCTGCTCTATTCCCTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGT
 GCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTC
 CAACTCAAGACCCAGGACCAACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACC
 ACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGGGGAAGATTGGTTGTGTCTGAAA
 GCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACA
 AACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCA
 TGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACAGTGTGAT
 GTGGATCTTTGGCTGATCAGCATTTCATGAAAAGGGTCACTATCAGACT
 TTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAAGTGTGTCATATTGCAGAAAC
 CATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGAT
 GGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGT

TGAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATT
 TGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGG
 TACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATAAACTTCCAAGGGATGCAT
 TTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCATGGGAAGTGGCTTC
 TCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAG
 GAGGAAATGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTGTGC
 ATAAAAAAGAGGCCCTGTTTAAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAAT
 GGCAATGCTCTGTGAAACCATGAAGAATGTTGGGATCAGACGCAGAGCC
 AGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAA
 CAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAA
 TGGTGAAGTTTCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRlla soluble humano (extracelular) es la siguiente:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGG
 AAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGA
 TAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAA
 ATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTG
 ATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGCTGTGAGGG
 CAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAG

5 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID NO: 5)

En este documento se dan a conocer polipéptidos ActRlla solubles. Según se describe en este documento, la expresión "polipéptido ActRlla soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que contienen un dominio extracelular de una proteína ActRlla. La expresión "polipéptido ActRlla soluble" según se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRlla, así como cualquiera de sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActRlla de unión a activina es aquel que conserva la capacidad de unirse a la activina, particularmente la activina AA, AB, BB. Preferentemente, un polipéptido ActRlla de unión a activina se unirá a la activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menor. Las secuencias de aminoácidos de la proteína precursora de ActRlla humana se proporcionan más adelante. El dominio extracelular de una proteína ActRlla se une a activina y es generalmente soluble y por lo tanto puede denominarse un polipéptido ActRlla de unión a activina, soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRlla de unión a activina solubles, incluyen el polipéptido soluble ilustrado en SEQ ID N°: 2, 3, 7, 12 y 13. SEC. ID N°: 7 se conoce como ActRlla-hFc y se describe más detalladamente en los ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActRlla de unión a activina solubles, comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRlla, por ejemplo, la secuencia líder melitina de miel de abeja (SEC. ID N°: 8), la secuencia líder activador del plasminógeno tisular (TPA) (SEC. ID N°: 9) o la secuencia líder ActRlla natural (SEC. ID N°: 10). El polipéptido ActRlla-hFc ilustrado en SEC. ID N°: 13 utiliza una secuencia líder TPA.

Los fragmentos funcionalmente activos de los polipéptidos ActRlla se pueden obtener mediante cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRlla. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente utilizando técnicas conocidas en el área como la técnica en fase sólida de Merrifield o la química f-Moc o t-Boc convencionales. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o por síntesis química) y probar para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRlla o la señalización mediada por activina.

Las variantes funcionalmente activas de los polipéptidos ActRlla se pueden obtener por cribado de genotecas de polipéptidos modificados producidos recombinantemente a partir de los ácidos nucleicos mutados correspondientes que codifican un polipéptido ActRlla. Las variantes se pueden producir y probar para identificar las que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRlla o la señalización mediada por activina. Una variante funcional de los polipéptidos ActRlla puede contener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 2 o 3.

Las variantes funcionales se pueden generar modificando la estructura de un polipéptido ActRlla para fines tales como mejorar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ejemplo, la vida útil ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Dichos polipéptidos ActRlla modificados cuando se seleccionan para que conserven la unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRlla naturales. Los polipéptidos ActRlla modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición

de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son los que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIa da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIa variante para producir una respuesta en las células de manera similar al polipéptido ActRIIa natural.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIa de la invención con el fin de alterar la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones se pueden seleccionar con el fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, como sitios de glucosilación unidos por O o por N. Los sitios de reconocimiento de la glucosilación unidos a asparagina comprenden generalmente una secuencia de tres péptidos, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocido específicamente por las enzimas de glucosilación celular adecuadas. La alteración también se puede hacer mediante adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIa natural (para sitios de glucosilación unidos por O). Diversas sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas posiciones del primer o tercer aminoácido de un sitio de reconocimiento de la glucosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) da lugar a una no-glucosilación en la secuencia del tripéptido modificado. Otra manera de aumentar el número de porciones carbohidrato en un polipéptido ActRIIa es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRIIa. Según el modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la 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., págs. 259-306. La eliminación de una o más porciones carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIa se puede hacer químicamente y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIa al ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química es descrita más detalladamente por Hakimuddin et al., (1987) Arch Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de porciones carbohidratos en los polipéptidos ActRIIa se puede lograr mediante el uso de diversas endo- y exo-glucosidasas según describen Thotakura et al (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIa se puede ajustar, según corresponda, en función del tipo de sistema de expresión utilizado, puesto que las células de mamíferos, levaduras, insectos y vegetales pueden introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden ser afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIa para usar en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporcione una glucosilación adecuada, como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamíferos, líneas celulares de levaduras con enzimas de glucosilación modificadas por ingeniería genética y células de insectos, también sean útiles.

Esta divulgación contempla además un método para generar mutantes especialmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIa, así como mutantes de truncamiento; las mezclas de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito del cribado de dichas genotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes del polipéptido ActRIIa que pueden actuar como agonistas o antagonistas, o alternativamente, que posean nuevas actividades todas juntas. Más adelante se proporcionan diversos ensayos de cribado, y dichos ensayos se pueden usar para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante del polipéptido ActRIIa puede cribarse respecto a su capacidad para unirse a un ligando de ActRIIa, para evitar la unión de un ligando de ActRIIa a un polipéptido ActRIIa o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIa.

La actividad de un polipéptido ActRIIa o de sus variantes también se puede probar en un ensayo basado en células o in vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido ActRIIa sobre la expresión de los genes involucrados en la producción de hueso o la destrucción de hueso. Esto se puede realizar, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas ligando de ActRIIa recombinadas (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido ActRIIa y/o sus variantes, y opcionalmente un ligando de ActRIIa. Asimismo, se puede administrar a un ratón u otro animal un polipéptido ActRIIa, y se pueden evaluar una o más propiedades óseas, como la densidad o el volumen. También se puede evaluar la tasa de cicatrización de fracturas óseas. La absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) es una técnica bien establecida, no invasiva, cuantitativa para evaluar la densidad ósea en un animal. En los seres humanos se pueden utilizar sistemas DEXA centrales para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores predictores de la densidad ósea general. También se pueden usar los sistemas DEXA periféricos para evaluar la densidad ósea en huesos periféricos, incluidos, por ejemplo, los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Se pueden usar sistemas de imágenes de rayos X tradicionales, inclusive tomografía computarizada, para evaluar el crecimiento

óseo y la cicatrización de fracturas. También se puede evaluar la resistencia mecánica del hueso.

Se pueden generar variantes derivadas combinatoriamente que tengan una potencia selectiva o generalmente mayor en relación con un polipéptido ActRIIa natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan vidas medias intracelulares marcadamente diferentes de la correspondiente a un polipéptido ActRIIa natural. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que resulten en la destrucción, o de lo contrario la inactivación, de un polipéptido ActRIIa natural. Dichas variantes y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido ActRIIa modulando la vida media de los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRIIa recombinado en el paciente. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden hacer en el ligador (si existe) y/o en la porción Fc para alterar la vida media de la proteína.

Una genoteca combinatoria se puede producir mediante una genoteca degenerada de genes que codifican una genoteca de polipéptidos cada uno de los cuales incluye al menos una porción de las posibles secuencias del polipéptido ActRIIa. Por ejemplo, se puede ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos a secuencias de genes de modo que el conjunto degenerado de las posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIa se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la expresión en fago).

Hay muchas maneras mediante las cuales se puede generar la genoteca de homólogos potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia de genes degenerados se puede llevar a cabo en un sintetizador automático de ADN y los genes sintéticos se pueden después ligar a un vector adecuado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en el área (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 pp 273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Dichas técnicas se emplearon 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; así como las patentes de los Estados Unidos N°: 5,223,409, 5,198,346 y 5,096,815).

Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una genoteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar variantes del polipéptido ActRIIa y aislar de una genoteca mediante cribado, usando, por ejemplo, mutagénesis por exploración de alanina y similares (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; y Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), mutagénesis por exploración de ligadores (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); mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); mutagénesis aleatoria, que incluye mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). La mutagénesis por exploración de ligadores, particularmente en un marco combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIa.

Una amplia gama de técnicas se conoce en el área para el cribado de productos génicos de genotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales y truncamientos y, de hecho, para el cribado de genotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad determinada. Dichas técnicas serán generalmente adaptables para el cribado rápido de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIa. Las técnicas más ampliamente utilizadas para el cribado de genotecas grandes comprende normalmente clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformando células adecuadas con la colección de vectores resultante y expresando los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada haga relativamente fácil el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa de la invención pueden contener además modificaciones postraduccionales además de todas las que estén naturalmente presentes en los polipéptidos ActRIIa. Dichas modificaciones incluyen, pero no exclusivamente, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIa modificados pueden contener elementos no aminoacídicos, como polietilenglicoles, lípidos, poli o mono sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIa se pueden analizar como se describe en este documento para otras variantes del polipéptido ActRIIa. Cuando se produce un polipéptido ActRIIa en las células por escisión de una forma incipiente del polipéptido ActRIIa, el procesamiento postraducciona también puede ser importante para el correcto plegado y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o

HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden elegir de modo de garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIa.

Las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIa incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIa y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no exclusivamente, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión con el fin de conferirle una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el propósito de purificación por afinidad, se usan matrices aplicables a cromatografía por afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión con el fin de facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIa. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP) así como " epítopos marcadores" que son secuencias de péptidos generalmente cortas para las cuales hay un anticuerpo específico disponible. Los epítopos marcadores bien conocidos para las cuales hay anticuerpos monoclonales específicos fácilmente obtenibles incluyen marcadores FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, como para el factor Xa o trombina, el cual permite a la proteasa pertinente digerir parcialmente las proteínas de fusión y de esa manera liberar de allí las proteínas recombinadas. Después, las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión por separación cromatográfica subsiguiente. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRIIa se fusiona con un dominio que estabiliza al polipéptido ActRIIa in vivo (un dominio "estabilizador"). Mediante "estabilizar" se quiere dar a entender cualquier cosa que aumente la vida media sérica, independientemente de si se debe a una menor destrucción, a una menor depuración por el riñón o a 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. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, como una estimulación adicional del crecimiento óseo o el crecimiento muscular, según se desee).

Como ejemplo específico, la que sigue es la secuencia de una proteína de fusión que contiene un dominio extracelular soluble de ActRIIa fusionado a un dominio Fc (por ejemplo SEC. ID N°: 6).

```

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKAL
FPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQFPENNYKTTTPVLDSDGPFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN(A) HYT
QKSLSLSPGK*

```

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc del mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene menor capacidad de unirse al receptor Fcγ en comparación con un dominio Fc natural. En otros casos, el dominio Fc del mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene mayor capacidad de unirse al receptor Fc relacionado con un MHC de clase I (FcRN) en comparación con un dominio Fc natural.

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden organizar de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa puede estar colocado C-terminal en relación con un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede estar colocado C-terminal en relación con un polipéptido ActRIIa. El dominio del polipéptido ActRIIa y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y puede haber otros dominios o secuencias de aminoácidos C- o N-terminales en relación con 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, dichas modificaciones potencian la vida media in vitro de los polipéptidos ActRIIa, aumentan la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIa o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIa. Esas modificaciones estabilizantes incluyen, pero no exclusivamente, proteínas de fusión (entre otras, por ejemplo, las proteínas de fusión que contienen un polipéptido ActRIIa y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluida, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRIIa) y modificaciones de la porción carbohidrato (como, por ejemplo, la

eliminación de porciones carbohidrato de un polipéptido ActRIIa). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIa se fusiona a un dominio estabilizador como una molécula de IgG (p. ej., un dominio Fc). Según se usa en este documento, la expresión "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas como una porción carbohidrato, o polímero no proteico, como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, la presente invención torna disponibles formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIa, que son aisladas de, o de lo contrario carecen sustancialmente de, otras proteínas. Los polipéptidos ActRIIa se producirán generalmente mediante la expresión de ácidos nucleicos recombinados.

3. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos ActRIIa

En ciertos aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinados que contienen la secuencia codificante del polipéptido ActRIIa de la invención como se describió antes. SEC. ID N°: 4 codifica el polipéptido precursor del ActRIIa humano natural, mientras SEC. ID N°: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Esos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ActRIIa o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en genoterapia).

Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos ActRIIa se entiende que incluyen los ácidos nucleicos que son variantes de SEC. ID N°: 4 o 5. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, como variantes alélicas.

Se dan a conocer secuencias aisladas o recombinadas de ácidos nucleicos que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID N°: 4 o 5. Un experto en el área comprenderá que las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a SEC. ID N°: 4 o 5, y las variantes de SEC. ID N°: 4 o 5 también se dan a conocer.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una genoteca de ADN.

En este documento se dan a conocer ácidos nucleicos que incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en SEC. ID N°: 4 o 5, la secuencia complementaria de SEC. ID N°: 4 o 5, o sus fragmentos. Como se discutió antes, un experto comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones rigurosas adecuadas que promueven la hibridación del ADN. Un experto comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones rigurosas adecuadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación en 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45 °C, seguida de un lavado de 2.0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado se puede seleccionar desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2.0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0.2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura del paso de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65 °C. Se pueden variar la temperatura y la concentración de sal, o se puede mantener constante la temperatura o la concentración de sal mientras se cambia la otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

También se dan a conocer en este documento ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos indicados en SEQ ID N°: 4 o 5 debido a la degeneración en el código genético.

Por ejemplo, varios aminoácidos son designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden causar mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que sí conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión existirán en células de mamíferos. Un experto comprenderá que esas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta alrededor de 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinados de la invención se pueden unir operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán en general adecuadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen en el área numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para diversas células huésped. Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no exclusivamente, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o

activadoras. La invención contempla promotores constitutivos o inducibles como los conocidos en el área. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Puede haber un constructo de expresión presente en una célula en un episoma, como un plásmido, o el constructo de expresión puede ser insertado en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en el área y variarán según la célula huésped utilizada.

En ciertos aspectos de la invención, el ácido nucleico en cuestión se provee en un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIa de la invención y está unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en el área y se eligen para dirigir la expresión de un polipéptido ActRIIa. En consecuencia, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen ejemplos de secuencias reguladoras en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquier secuencia de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión, que controle la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella en esos vectores, para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIa. Dichas secuencias de control de la expresión útiles, incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor inmediato temprano del adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema de lac, el sistema del trp, el sistema de TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la T7 ARN polimerasa, las principales regiones promotora y operadora del fago lambda, las regiones de control de la proteína de la envoltura de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura, el promotor del poliedro del sistema del baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de éstos. Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Por otra parte, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como marcadores de antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinado de la invención ligando el gen clonado, o una porción de éste, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas o células eucariotas (levaduras, aves, insectos o mamíferos) o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIa recombinado incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen a la vez secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en las bacterias y una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en las células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de esos vectores son modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a los fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, se pueden usar derivados de virus como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o el virus Epstein - Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión viral (incluida retroviral) se pueden encontrar más adelante en la descripción de los sistemas de administración de genoterapia. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huéspedes son muy conocidos en el área. Por otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como por procedimientos generales de recombinación, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser conveniente expresar los polipéptidos recombinados mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (como los β -gal que contienen pBlueBac III).

En una realización preferida, se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIa en cuestión en células CHO; como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Como resultará evidente, los constructos génicos en cuestión se pueden utilizar para causar la expresión de los polipéptidos ActRIIa en cuestión en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, inclusive proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

Esta invención también se refiere a una célula huésped transfectada con un polinucleótido recombinado de la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa de la invención se puede expresar en células bacterianas, como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, mediante

un sistema de expresión de baculovirus), levaduras, o células de mamíferos. Los expertos conocen otras células huésped adecuadas.

En consecuencia, la presente invención se refiere además a métodos para producir los polipéptido ActRIIa en cuestión. Por ejemplo, una célula huésped transinfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIa se puede cultivar en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIa. El polipéptido ActRIIa puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contenga el polipéptido ActRIIa. Alternativamente, se puede retener el polipéptido ActRIIa citoplasmáticamente o en una fracción de la membrana y cosechar y lisar las células, y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en el área. Los polipéptidos ActRIIa en cuestión se pueden aislar del medio de cultivo celular, de las células huésped o de ambos, utilizando técnicas conocidas en el área para la purificación de proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de los polipéptidos ActRIIa y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ActRIIa (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIa-Fc). En una realización preferida, el polipéptido ActRIIa es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferida, la purificación se logra mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, incluidos, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en sefarosa Q, cromatografía en fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración viral e intercambio de solución amortiguadora. Como se demostró en este documento, la proteína ActRIIa-hFc se purificó hasta una pureza >98% según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según se determinó por SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables en huesos de ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otra realización un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, como una secuencia del sitio de escisión de poli-(His) por enteroquinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRIIa recombinado, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina metálica de Ni^{2+} . A continuación se puede eliminar la secuencia líder de purificación por tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIa purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican secuencias de polipéptidos diferentes se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o irregulares para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos adecuados, relleno de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se puede llevar a cabo la amplificación por PCR de fragmentos del gen utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarias entre dos fragmentos del gen consecutivos que posteriormente se pueden aparear para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Ejemplos de usos terapéuticos

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa de la invención se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o afección que esté asociada a daño óseo ya sea, por ejemplo, a través de ruptura, pérdida o desmineralización. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a tratar o prevenir el daño óseo en un individuo que lo necesita, mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ActRIIa. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a promover el crecimiento óseo o la mineralización ósea en un individuo que lo necesita, mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ActRIIa. Éstos apuntan preferentemente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y muy preferentemente de humanos. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona el uso del polipéptidos ActRIIa para el tratamiento de trastornos asociados con baja densidad ósea o disminución de la resistencia ósea.

Según se usa en este documento, un agente terapéutico que "evita", un trastorno o una afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la incidencia del trastorno o la afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control sin tratar, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o la afección en relación con la muestra de control sin tratar. El término "tratar" según se usa en este documento incluye la profilaxis de la afección mencionada o la mejoría o eliminación de la afección una vez que se ha instalado. En cualquiera de los casos, la prevención o el tratamiento se puede discernir del diagnóstico provisto por el médico y del resultado buscado con la administración del agente terapéutico.

La invención se refiere a inducir la formación de hueso y/o cartílago, prevenir la pérdida ósea, aumentar la mineralización ósea o prevenir la desmineralización ósea. Por ejemplo los polipéptidos ActRIIa de la invención tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y la cicatrización de fracturas óseas y defectos de cartílagos en humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRIIa pueden ser útiles en pacientes que tienen un diagnóstico de baja densidad ósea subclínica, como una medida protectora contra el progreso de la osteoporosis.

En una realización específica, las composiciones de la presente invención pueden encontrar utilidad médica en la cicatrización de fracturas óseas y defectos de los cartílagos en humanos y otros animales. Las composiciones en cuestión también pueden tener un uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas así como abiertas y también en la mejor fijación de articulaciones artificiales. La formación de hueso de novo inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo o inducidos por resección oncológica, y también es útil en cirugía plástica estética. En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIa en cuestión pueden proporcionar un entorno que atraiga células formadoras de hueso, estimule la proliferación de células formadoras de hueso o induzca la diferenciación de los progenitores de las células formadoras de hueso. Los polipéptidos ActRIIa de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de la osteoporosis.

Las composiciones de la invención se pueden aplicar a afecciones caracterizadas por o que causan pérdida ósea, como osteoporosis (incluida osteoporosis secundaria), hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, enfermedad de Paget, tirotoxicosis, estado de diarrea crónica o malabsorción, acidosis tubular renal o anorexia nerviosa.

La osteoporosis puede ser causada por, o estar asociada a, diversos factores. Ser mujer, particularmente mujer posmenopáusica, tener bajo peso corporal, y llevar un estilo de vida sedentario, son todos factores de riesgo de osteoporosis (pérdida de la densidad mineral ósea que conduce a riesgo de fractura). Las personas que tienen alguno de los perfiles siguientes pueden ser elegibles para el tratamiento con un polipéptido ActRIIa de la invención: una mujer posmenopáusica que no tome estrógenos ni reciba otra terapia de reemplazo; una persona con antecedentes personales o maternos de fractura de cadera o fumadora; una mujer posmenopáusica cuya altura sea de (por encima de 1.68 m) o pese (menos de 57 kg); un hombre con afecciones clínicas asociadas a pérdida de hueso; una persona que use medicamentos que se sabe que provocan pérdida de hueso, incluidos corticosteroides como Prednisona™, diversos medicamentos anticonvulsivantes como Dilantin™ y ciertos barbituratos, o dosis altas de agente terapéuticos para reemplazo de la tiroides; una persona que tenga diabetes tipo 1, enfermedad hepática, enfermedad renal o antecedentes familiares de osteoporosis; una persona que tenga elevado recambio óseo (p. ej., colágeno en exceso en las muestras de orina); una persona con una afección tiroidea como hipertiroidismo; una persona que haya sufrido una fractura después de un traumatismo leve; una persona que tenga pruebas radiográficas de fracturas vertebrales u otros signos de osteoporosis.

Como se indicó antes, la osteoporosis también puede surgir como una afección asociada a otro trastorno o debido al uso de ciertos medicamentos. La osteoporosis debida a medicamentos u otra afección médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una afección conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad en exceso de cortisol producida por el organismo produce osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados con osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque los niveles adecuados de hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroides) son necesarias para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormonas tiroideas puede disminuir la masa ósea con el paso del tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden producir pérdida ósea cuando personas con problemas renales los toman en dosis altas, particularmente los que se someten a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbituratos que se usan para evitar las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un medicamento para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunitarios; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un medicamento utilizado para tratar enfermedades autoinmunitarias y para suprimir el sistema inmunitario en pacientes con trasplante de órganos; los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), utilizados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), utilizado para tratar la hipercolesterolemia. La pérdida ósea resultante del tratamiento contra el cáncer es ampliamente conocida y se denomina pérdida ósea inducida por tratamiento contra el cáncer (CTIBL). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden ser corregidas mediante tratamiento con antagonistas de activina-ActRIIa.

En una realización preferida, los polipéptidos ActRIIa de la invención se pueden usar en pacientes con cáncer. Los pacientes que tienen ciertos tumores (por ejemplo de próstata, mama, mieloma múltiple y cualquier tumor que cause hiperparatiroidismo) corren el riesgo de pérdida ósea debida a pérdida ósea inducida por el tumor así como por metástasis óseas y agentes terapéuticos. Dichos pacientes pueden ser tratados con polipéptidos ActRIIa de la invención incluso en ausencia de evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas, y pueden ser tratados con los polipéptidos ActRIIa de la invención en el caso de que los indicadores sugirieran un aumento del riesgo. Generalmente, se emplean exploraciones DEXA para evaluar cambios en la densidad ósea, mientras los indicadores de la remodelación ósea se pueden usar para evaluar la probabilidad de metástasis óseas. Se pueden controlar los marcadores séricos. La fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP) es una enzima que está presente en los

osteoblastos. Los niveles sanguíneos de BSAP están aumentados en pacientes con metástasis óseas y otras afecciones que producen un aumento en la remodelación ósea. Los péptidos osteocalcina y procolágeno también están asociados a la formación de hueso y a las metástasis óseas. Se han detectado aumentos en BSAP en pacientes con metástasis óseas causadas por cáncer de próstata, y en menor medida, en metástasis óseas de

5 cáncer de mama. Los niveles de proteína morfogenética ósea 7 (bump-7) son altos en el cáncer de próstata que metastatizó al hueso, pero no en metástasis óseas debidas a cáncer de vejiga, piel, hígado o pulmón. El telopéptido carboxi-terminal tipo I (ICTP) es una reticulación que se encuentra en el colágeno que se forma durante la resorción ósea. Como el hueso está constantemente quebrándose y volviéndose a formar, el ICTP se encontrará en todo el organismo. Sin embargo, en el lugar de la metástasis ósea, el nivel será significativamente superior que en una zona

10 de hueso normal. El ICTP se encontró en altos niveles en metástasis óseas debidas a cáncer de próstata, pulmón y mama. Otra reticulación de colágeno, el telopéptido N-terminal (NTx), es producido junto con el ICTP durante el recambio óseo. La cantidad de NTx está aumentada en metástasis óseas causadas por muchos tipos diferentes de cáncer incluidos de pulmón, próstata y mama. Asimismo, los niveles de NTx aumentan con el progreso de las metástasis óseas. Por consiguiente, este marcador se puede utilizar tanto para detectar metástasis así como para medir la magnitud de la enfermedad. Otros marcadores de la resorción incluyen piridinolina y desoxipiridinolina. Cualquier aumento en los marcadores de resorción o los marcadores de metástasis ósea indica la necesidad de un

15 tratamiento con antagonistas de activina-ActRlla en un paciente.

Los polipéptidos ActRlla de la invención se pueden administrar conjuntamente con otros agentes farmacéuticos. La administración conjunta se puede llevar a cabo mediante administración de una única coformulación, mediante

20 administración simultánea o mediante administración en momentos diferentes. Los polipéptidos ActRlla de la invención pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros principios activos para el hueso. Un paciente puede beneficiarse al recibir conjuntamente polipéptido ActRlla y tomar suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio adecuado y/o, en algunos casos, otro medicamento. Los ejemplos de otros medicamentos incluyen

25 bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), la calcitonina, los estrógenos y el raloxifeno afectan el ciclo de remodelación ósea y se clasifican como medicamentos antirresortivos. La remodelación ósea consta de dos etapas diferentes: la resorción ósea y la formación de hueso. Los medicamentos antiresortivos enlentecen o

30 detienen la porción de resorción ósea del ciclo de remodelación ósea pero no enlentecen la porción de formación de hueso del ciclo. Como resultado, continúa la nueva formación a una tasa mayor que la de resorción ósea y la densidad ósea puede aumentar con el tiempo. Teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, aumenta la tasa 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 por semana) de la osteoporosis posmenopáusica. El alendronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo

35 de fracturas de columna, muñeca y cadera. El alendronato también está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres como resultado del uso de estos medicamentos a largo plazo (es decir, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de la osteoporosis en hombres. El alendronato más vitamina D está aprobado para el tratamiento del osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (70 mg una vez por semana más vitamina D), y para el tratamiento para mejorar la masa ósea en los hombres con osteoporosis. El

40 ibandronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Cuando se lo toma como una pastilla de una vez al mes (150 mg), el ibandronato se debe tomar el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. El risedronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de osteoporosis posmenopáusica. Cuando se lo toma diariamente (dosis de 5 mg) o semanalmente (dosis de 35 mg o dosis de 35 mg con calcio), el risedronato enlentece

45 la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna y otras fracturas que no son de columna. El risedronato también está aprobado para usar en hombres y mujeres para prevenir y/o tratar la osteoporosis inducida por glucocorticoides que resulta del uso de estos medicamentos (es decir, prednisona o cortisona) a largo plazo. La calcitonina es una hormona que se produce naturalmente involucrada en la regulación del calcio y el metabolismo óseo. En mujeres que tienen más de 5 años de posmenopausia, la calcitonina enlentece

50 la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea de la columna, y puede aliviar el dolor asociado a fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de fracturas de columna. La calcitonina está disponible como una inyección (50-100 UI diariamente) o como un aerosol nasal (200 UI diariamente). La terapia con estrógenos (TE)/la terapia hormonal (TH) está aprobada para la prevención de la osteoporosis. La TE ha demostrado que reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea tanto en la columna como en la cadera, y reduce el riesgo de fractura de cadera y de columna en

55 mujeres posmenopáusicas. La TE se administra comúnmente en forma de una pastilla o un parche cutáneo que libera una dosis baja de aproximadamente 0.3 mg por día o una dosis estándar de aproximadamente 0.625 mg por día y es eficaz incluso cuando se inicia después de los 70 años. Cuando el estrógeno se toma sólo, puede aumentar el riesgo de que la mujer presente cáncer del revestimiento del útero (cáncer de endometrio). Para eliminar este riesgo, los proveedores de asistencia sanitaria prescriben la hormona progestina en combinación con el estrógeno

60 (terapia de reemplazo hormonal o TH) a las mujeres que tienen un útero intacto. La TE/TH alivia los síntomas posmenopáusicos y ha demostrado que tiene un efecto beneficioso sobre la salud ósea. Los efectos secundarios pueden incluir hemorragia vaginal, tensión en las mamas, cambios de humor y enfermedad de la vesícula. El raloxifeno, 60 mg por día, está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Pertenece a una clase de medicamentos denominados moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

(SERM) que se desarrollaron para proporcionar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin sus potenciales desventajas. El raloxifeno aumenta la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. Aún no se dispone de datos para demostrar que el raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras fracturas que no sean de columna. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y en hombres que tienen alto riesgo de sufrir una fractura. Este medicamento estimula la formación de hueso nuevo y aumenta significativamente la densidad mineral ósea. En mujeres posmenopáusicas, la reducción de las fracturas se notó en la columna, la cadera, el pie, las costillas y la muñeca. En los hombres, la reducción de las fracturas se notó en la columna, pero los datos fueron insuficientes para evaluar la reducción de las fracturas en otros lugares. La teriparatida se autoadministra como una inyección diaria durante no más de 24 meses.

5. Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa de la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa se puede administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión se pueden formular para la administración de cualquier manera conveniente para el uso en medicina humana o veterinaria.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a la administración de la composición por vía sistémica o local como un implante o dispositivo. Cuando se administra la composición terapéutica para usar en esta invención, se encuentra, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, apirógena. Otros agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos ActRIIa que también se pueden incluir en la composición como se describió antes, se pueden administrar simultáneamente o consecutivamente con los compuestos en cuestión (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa).

Normalmente, los polipéptidos ActRIIa de la invención se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden contener uno o más polipéptidos ActRIIa en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, soluciones amortiguadoras, bacteriostáticos, solutos que tornan la formulación isotónica con la sangre del destinatario, o suspendentes o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para la liberación en el lugar deseado del tejido (por ejemplo, el hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de liberar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa) a un lugar deseado del tejido (por ejemplo, el hueso), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el organismo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIa. Dichas matrices se pueden elaborar de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantables.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto estético y las propiedades de la interfaz. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirá la formulación adecuada. Las matrices posibles para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales posibles son biodegradables y biológicamente bien definidos, como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices posibles son no biodegradables y químicamente definidas, como hidroxapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos anteriores de materiales, como ácido poliláctico e hidroxapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Se puede alterar la composición de las biocerámicas como en fosfato aluminato de calcio y procesar para modificar el tamaño del poro, el tamaño de partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (utilizando una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales, y análogos, cada uno con una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un fármaco también se puede administrar en

forma de bolo, remedio azucarado o pasta.

En las formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, como citrato de sodio, fosfato dicálcico, o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o diluyentes, como almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, como glicerol; (4) desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) retardantes de la solución, como parafina; (6) aceleradores de la absorción, como compuestos de amonio cuaternario; (7) humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de éstos; y (10) colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir soluciones amortiguadoras. También se pueden emplear composiciones sólidas de tipo similar como relleno de cápsulas de gelatina blanda y dura, utilizando excipientes como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, emulsiones microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en el área, como agua u otros solventes, solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de sorbitán de ácidos grasos y sus mezclas. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes como humectantes, emulsionantes y suspendentes, edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumes y conservantes.

Las suspensiones, además de los principios activos, pueden contener suspendentes como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes, como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Se puede prevenir la acción de los microorganismos mediante la inclusión de varios antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio y análogos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico teniendo en cuenta diversos factores que modifican la acción de los compuestos en cuestión de la invención. Los diversos factores incluyen, pero no exclusivamente, la cantidad de masa ósea que se desea que se forme, el grado de pérdida de la densidad ósea, en lugar del daño óseo, la condición del hueso dañado, la edad, el género 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 dosis puede variar con el tipo de matriz utilizada en la reconstitución y los tipos de compuestos de la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosis. La evolución se puede controlar mediante evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación del hueso por ejemplo, por rayos X (incluida DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcado con tetraciclina.

Los experimentos con ratones demostraron que los efectos de ActRIIa-Fc sobre el hueso son detectables cuando el compuesto se administra a intervalos y en cantidades suficientes para lograr concentraciones séricas de 0.2 µg/kg o mayores, y son deseables niveles séricos de 1 µg/kg o 2 µg/kg o mayores para lograr efectos significativos sobre la densidad y la resistencia óseas. Aunque no hay indicaciones de que dosis mayores de ActRIIa-Fc sean indeseables debido a efectos secundarios, se pueden diseñar los regímenes de dosificación para alcanzar concentraciones séricas entre 0.2 y 15 µg/kg, y opcionalmente entre 1 y 5 µg/kg. En seres humanos, se pueden alcanzar niveles séricos de 0.2 µg/kg con una sola dosis de 0.1 mg/kg o mayor y se pueden lograr niveles séricos de 1 µg/kg con una sola dosis de 0.3 mg/kg o mayor. La vida media sérica observada de la molécula es entre alrededor de 20 y 30 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión de Fc y por lo tanto se puede lograr un nivel sérico eficaz sostenido, por ejemplo, administrando alrededor de 0.2 a 0.4 mg/kg semanal o quincenalmente, o se pueden utilizar dosis más altas a intervalos más prolongados entre administraciones. Por ejemplo, se podrían usar dosis de 1 a 3 mg/kg en una base mensual o bimensual, y el efecto sobre el hueso puede ser suficientemente perdurable para que la administración sea necesaria sólo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses.

En este documento se da a conocer la genoterapia para la producción in vivo de polipéptidos ActRIIa. Dicha terapia

lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos ActRIIa en células o tejidos que tienen los trastornos mencionados antes. La administración de secuencias de polinucleótidos ActRIIa se puede lograr usando un vector de expresión recombinante como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere el uso de liposomas dirigidos para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos ActRIIa.

Se pueden usar diversos vectores virales para la genoterapia como se indica en este documento que incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o preferentemente un virus de ARN como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus aviar o murino. Los ejemplos de vectores retrovirales en los cuales se puede insertar un solo gen foráneo incluyen, pero no exclusivamente: 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 (VRS). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos esos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan ser identificadas y generadas. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos del objetivo uniéndoles, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. La administración dirigida preferida se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en el área reconocerán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unir a una envoltura viral para permitir la administración específica en el objetivo del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIa. En una realización preferida, el vector es dirigido al hueso o el cartílago.

Alternativamente, las células de cultivo tisular se pueden transinfectar directamente con plásmidos que codifican los genes retrovirales estructurales gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. Luego, esas células se transinfectan con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para los polinucleótidos ActRIIa es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales, útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. Los viriones de ARN, ADN e intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y administrar a las células en una forma biológicamente activa (véase por ej., Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). En el área se conocen métodos para la transferencia eficaz de genes usando un vehículo de liposoma, véase p. ej., Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden utilizar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, como el fosfatidilglicerol, la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, los esfingolípidos, los cerebrósidos y los gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. La administración dirigida de los liposomas también es posible basándose en, por ejemplo, la especificidad por el órgano, la especificidad por la célula y la especificidad por el organelo, como se sabe en el área.

Ejemplos

La invención se describirá en general, será más fácil de entender por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen sólo a efectos ilustrativos de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Proteínas de fusión ActRIIa-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActRIIa soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIa humana fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un ligador mínimo entre ellos. Los constructos se denominan ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc, respectivamente.

A continuación se muestra ActRIIa-hFc como como se purificó de líneas celulares CHO (SEC. ID N°: 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI
EIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV
TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HODWLNKEYKCKVSNKALPVPPIEKISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Las proteínas ActRlla-hFc y ActRlla-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

1. (i) Melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEC. ID N°: 8)
2. (ii) Activador del plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEC. ID N°: 9)
3. (iii) Natural: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEC. ID N°: 10).

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

MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQT
GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKD
SPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCKVSNKALPVPPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

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

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAG
CAGTCTTCGTTTCGCCCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAG
GAGTGTCTTTTAAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAC
TGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTG
CTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTT
GGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAA
AGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATG
AAAAGTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAAT
CCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCAC
CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGA
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
 GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAT
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
 CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

Tanto ActRlla-hFc como ActRlla-mFc fueron notablemente propensas a la expresión recombinante. Como se muestra en la figura 1, la proteína se purificó como un pico de proteína único y bien definido. La secuenciación N-terminal mostró una sola secuencia de ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11). La purificación se puede lograr mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en sefarosa Q, cromatografía en fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración viral e intercambio de solución amortiguadora. La proteína ActRlla-hFc se purificó hasta una pureza >98% según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño y > 95% según se determinó por SDS PAGE.

ActRlla-hFc y ActRlla-mFc mostraron una gran afinidad por los ligandos, particularmente activina A. GDF-11 o Activina A ("ActA") se inmovilizaron en un chip CM5 de Biacore usando un procedimiento de acoplamiento de amina estándar. Se cargaron las proteínas ActRlla-hFc y ActRlla-mFc en el sistema y se midió la unión. ActRlla-hFc se unió a la activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{-12} y la proteína se unió a GDF11 con una K_D de 9.96×10^{-9} . Véase la figura 2. ActRlla-mFc se comportó de manera similar.

Se usó un ensayo con el gen reportero A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRlla-hFc sobre la señalización por GDF-11 y Activina A. Línea celular: rhabdomyosarcoma humano (derivado de un). Vector reportero: pGL3 (CAGA)12 (descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Véase la figura 3. El motivo CAGA12 está presente en los genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores que señalizan a través de Smad 2 y 3.

Día 1: dividir las células A-204 en placas de 48 pocillos.

Día 2: transfectar las células A-204 con 10 µg de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12 (10 µg)+ pRLCMV (1 µg) y Eugene.

Día 3: agregar factores (diluidos en el medio + 0.1% de BSA). Los inhibidores necesitan ser preincubados con factores durante 1 h antes de agregarlos a las células. 6 hs más tarde, mejorar la célula con PBS y lisar las células.

Esto es seguido de un ensayo de Luciferasa. Normalmente en este ensayo, en ausencia de todo inhibidor, la activina A muestra aproximadamente 10 veces la estimulación de la expresión del gen reportero y una $DE_{50} \sim 2$ ng/ml. GDF-11: 16 veces la estimulación, $DE_{50} = 1.5$ ng/ml. GDF-8 muestra un efecto similar al de GDF-11.

Como se muestra en la figura 4, ActRlla-hFc y ActRlla-mFc inhiben la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares. Como se muestra en la figura 5, tres preparaciones diferentes de ActRlla-hFc inhibieron la señalización por GDF-11 con una CI_{50} de aproximadamente 200 pM.

ActRlla-hFc fue muy estable en los estudios farmacocinéticos. Se administraron a ratas 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActRlla-hFc y se midieron los niveles plasmáticos de la proteína a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio aparte, se administraron a ratas 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En las ratas, ActRlla-hFc tuvo una vida media sérica de 11 a 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron bastante altos después de dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.) En monos filipinos, la vida media plasmática fue sustancialmente mayor de 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10

mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente. Los resultados preliminares en humanos sugieren que la vida media sérica es entre aproximadamente 20 y 30 días.

Ejemplo 2: ActRlla-mFc promueve el crecimiento óseo in vivo

Se administró ActRlla-mFc a ratonas normales (BALB/c) a una concentración 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 del hueso por DEXA, véase la figura 6.

En las ratonas BALB/c, las exploraciones DEXA mostraron un aumento significativo (>20%) en la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo como resultado del tratamiento con ActRlla-mFc. Véanse las figuras 7 y 8.

Por lo tanto, el antagonismo de ActRlla causó un incremento de la densidad ósea y el contenido en ratonas normales. Como paso siguiente, se probó el efecto de ActRlla-mFc sobre el hueso en un modelo de ratón para osteoporosis.

Andersson et al. (2001), establecieron que las ratonas ovariectomizadas sufrieron una pérdida ósea sustancial (aproximadamente 50% de pérdida del hueso trabecular 6 semanas posoperación) y que la pérdida ósea en esas ratonas se pudo corregir con los potenciales agentes terapéuticos, como la hormona paratiroidea.

Los solicitantes utilizaron ratonas C57BL6 que fueron ovariectomizadas (OVX) u operadas falsamente a las 4 a 5 semanas de vida. Ocho semanas después de la cirugía, se inició el tratamiento con ActRlla-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) o control (PBS). Se midió la densidad ósea con una tomografía computarizada.

Como se muestra en la figura 9, las ratonas sin tratar, ovariectomizadas mostraron una pérdida sustancial de la densidad ósea trabecular respecto a las ratonas de control falsamente operadas después de seis semanas. El tratamiento con ActRlla-mFc restauró la densidad ósea al nivel de las ratonas falsamente operadas. A las semanas 6 y 12 del tratamiento, ActRlla-mFc causó un aumento sustancial en el hueso trabecular de las ratonas OVX. Véase la figura 10. Después de 6 semanas de tratamiento, aumentó la densidad ósea en 24% respecto a los controles con PBS. Después de 12 semanas, el aumento fue de 27%.

En las ratonas falsamente operadas, ActRlla-mFc también causó un aumento sustancial en el hueso trabecular. Véase la figura 11. Después de 6 y 12 semanas, el tratamiento produjo un 35% de aumento respecto a los controles.

En un conjunto adicional de experimentos, ratonas ovariectomizadas (OVX) o falsamente operadas como se describió antes se trataron con ActRlla-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) o control (PBS) durante doce semanas. De manera similar a los resultados descritos antes para ActRlla-mFc, las ratonas OVX que recibieron ActRlla-mFc mostraron un aumento en la densidad ósea trabecular de 15% tan pronto como a las 4 semanas y de 25% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 12). Las ratonas falsamente operadas que recibieron ActRlla-mFc mostraron similarmente un aumento en la densidad ósea trabecular de 22% tan pronto como a las cuatro semanas y de 32% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 13).

Después de 12 semanas de tratamiento con ActRlla-mFc, los análisis DEXA del cuerpo entero y del fémur ex vivo mostraron que el tratamiento induce un aumento en la densidad ósea tanto en las ratonas ovariectomizadas como falsamente operadas (Figuras 14A y 14B, respectivamente). Esos resultados también son respaldados por los análisis pQCT ex vivo de la diáfisis media femoral que demostraron un aumento significativo de la densidad ósea tanto cortical como total después de doce semanas de tratamiento con ActRlla-mFc. Las ratonas ovariectomizadas de control tratadas con vehículo mostraron densidades óseas que fueron semejantes a las ratonas falsamente operadas tratadas con vehículo (Figura 15). Además de la densidad ósea, también aumentó el contenido óseo luego del tratamiento con ActRlla-mFc. Los análisis pQCT ex vivo de la diáfisis media femoral demostraron un aumento significativo en el contenido óseo tanto cortical como total después de doce semanas de tratamiento con ActRlla-mFc mientras que las ratonas de control tratadas con vehículo tanto ovariectomizadas como falsamente operadas mostraron un contenido óseo semejante (Figura 16). Los análisis pQCT ex vivo de la diáfisis media femoral mostraron que las ratonas tratadas con ActRlla-mFc no mostraron un cambio en la circunferencia perióstica; sin embargo el tratamiento con ActRlla-mFc produjo una disminución en la circunferencia endóstica lo que indica un aumento en el espesor cortical debido al crecimiento en la superficie interna del fémur (Figura 17).

Las pruebas mecánicas de fémures determinaron que ActRlla-mFc era capaz de aumentar las características extrínsecas del hueso (carga máxima, rigidez y energía para romperlo) que contribuyó a un aumento significativo en las propiedades intrínsecas (resistencia última) de los huesos. Las ratonas ovariectomizadas tratadas con ActRlla-mFc mostraron mayor resistencia ósea a niveles más allá de los de las ratonas de control tratadas con vehículo, falsamente operadas, lo que indica una reversión completa del fenotipo osteoporótico (Figura 18).

Estos datos demuestran que un antagonista de activina-ActRlla puede aumentar la densidad ósea en ratonas

normales y, además, corregir los defectos en la densidad ósea, el contenido óseo y en última instancia la resistencia ósea, en un modelo de ratón de osteoporosis.

En otro conjunto de experimentos, las ratonas fueron ovariectomizadas o falsamente operadas a las 4 semanas, y a partir de las 12 semanas recibieron placebo o ActRlla-mFc (2 veces/semana, 10 mg/kg) (también denominado RAP-11 en las figuras 19 a 24), durante un periodo adicional de 12 semanas. Se evaluaron diversos parámetros óseos. Como se muestra en la figura 19, ActRlla-mFc aumentó las relaciones entre volumen del hueso trabecular vertebral y volumen total (BV/TV) tanto en las ratonas OVX como falsamente operadas. ActRlla-mFc también mejoró la arquitectura trabecular (Figura 20), aumentó el espesor cortical (Figura 21) y mejoró la resistencia ósea (Figura 22). Como se muestra en la figura 23, ActRlla-mFc produjo efectos deseables en un rango de dosis de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

La histomorfometría ósea se llevó a cabo al tiempo correspondiente a 2 semanas en las ratonas falsamente operadas. Estos datos, presentados en la Figura 24, demuestran que ActRlla-mFc tiene un efecto dual, inhibe la resorción ósea y promueve el crecimiento óseo. Por lo tanto, ActRlla-mFc estimula el crecimiento óseo (efecto anabólico) e inhibe la resorción ósea (efecto anticatabólico).

Ejemplo 4: Proteínas ActRlla-Fc alternativas

Un constructo alternativo puede tener una delección de la cola C-terminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRlla). A continuación se presenta la secuencia para dicho constructo (porción Fc subrayada) (SEC. ID N°: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI
 EIVKQGCWLLDDINCYDRTDCVEKKDSPVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMTG
GGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCK
VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFS
CS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la cual el extremo N-terminal es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11).
2. El polipéptido ActRIIa de unión a activina de la reivindicación 1, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°:7.
3. El polipéptido ActRIIa de unión a activina de las reivindicaciones 1 o 2, donde el polipéptido es al menos 95% puro con respecto a los contaminantes proteicos, según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño.
4. El polipéptido ActRIIa de unión a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polipéptido presenta al menos 10 veces la selectividad en la constante de disociación por activina frente a GDF-11.
5. Una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido ActRIIa de unión a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. La preparación farmacéutica de la reivindicación 5, en la que dicha preparación es sustancialmente apirógena.
7. Un polinucleótido aislado que contiene una secuencia codificante del polipéptido ActRIIa de unión a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. El polinucleótido aislado de la reivindicación 7, donde el polinucleótido aislado comprende una secuencia de SEC. ID N°: 14.
9. Un polinucleótido recombinado que comprende una secuencia promotora unida operativamente a un polinucleótido de las reivindicaciones 7 u 8.
10. Una célula transformada con un polinucleótido recombinado de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
11. La célula de la reivindicación 10, donde la célula es una célula de mamífero.
12. La célula de la reivindicación 11, donde la célula es una célula CHO o una célula humana, donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana ni una célula germinal humana.
13. Un método para preparar un polipéptido ActRIIa de unión a activina, que comprende: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIa soluble, donde dicha célula es transformada con un polinucleótido recombinado de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9; y b) recuperar el polipéptido ActRIIa de unión a activina así expresado.
14. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal del polipéptido es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11), para usar en la promoción del crecimiento óseo, aumentar la densidad ósea o aumentar la resistencia ósea.
15. El polipéptido de la reivindicación 14, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°:7.
16. El polipéptido de las reivindicaciones 14 o 15, donde el polipéptido puede tener una o más de las características siguientes i) se une a un ligando de ActRIIa con una K_D de al menos 10^{-7} M; e ii) inhibe la señalización de ActRIIa en una célula.
17. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde dicho polipéptido incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados, seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica y un aminoácido conjugado a un agente de derivación orgánico.
18. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal del polipéptido es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11), para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.
19. El polipéptido de la reivindicación 18, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°:7.
20. El polipéptido de las reivindicaciones 18 o 19, donde el polipéptido puede tener una o más de las características

siguientes i) se une a un ligando de ActRIIa con una K_D de al menos 10^{-7} M; e ii) inhibe la señalización de ActRIIa en una célula.

21. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde dicho polipéptido incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados, seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica y un aminoácido conjugado a un agente de derivación orgánico.

22. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde el trastorno relacionado con los huesos se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis primaria y osteoporosis secundaria.

23. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde el trastorno relacionado con los huesos se selecciona del grupo que consiste en: osteoporosis post-menopáusica, pérdida ósea por hipogonadismo, pérdida de masa ósea inducida por un tumor, pérdida de masa ósea inducida por tratamiento contra el cáncer, metástasis óseas, mieloma múltiple y enfermedad de Paget.

24. Una combinación que comprende (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal del polipéptido es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11), y (b) un agente seleccionado del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un estrógeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos, una hormona paratiroidea, una calcitonina, un complemento de calcio y un complemento de vitamina D para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.

25. La combinación de la reivindicación 24, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°: 7.

26. Una preparación farmacéutica que comprende (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal del polipéptido es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11); y (b) un agente seleccionado del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un estrógeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos, una hormona paratiroidea, una calcitonina, un complemento de calcio y un complemento de vitamina D.

27. La preparación farmacéutica de la reivindicación 26, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°: 7.

28. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal del polipéptido es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11), para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.

29. El uso de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la que el extremo N-terminal del polipéptido es ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11), en la fabricación de un medicamento para prevenir un trastorno relacionado con los huesos.

30. El polipéptido de la reivindicación 28 o el uso de la reivindicación 29, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°: 7.

31. El polipéptido de las reivindicaciones 28 o 30 o el uso de las reivindicaciones 29 o 30, donde el trastorno relacionado con los huesos es cáncer que está asociado a metástasis óseas.

32. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 28 o 30 a 31, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde el trastorno relacionado con los huesos es pérdida ósea asociada a un régimen de tratamiento contra el cáncer.

33. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 28 o 30 a 31, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde el trastorno relacionado con los huesos es cáncer asociado a pérdida ósea.

34. El polipéptido ActRIIa de unión a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la preparación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 o 26 a 27, el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, 28 o 30 a 33, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33 donde el polipéptido es glucosilado.

35. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, 28 o 30 a 33, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33, donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido consiste en SEC. ID N°: 7.

36. Una proteína de fusión ActRIIa-Fc, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7, en la cual el extremo N-terminal del polipéptido es

ILGRSETQE (SEC. ID N°: 11), para usar en la promoción del crecimiento óseo y la inhibición de la resorción ósea en un paciente.

- 5 37. La proteína de fusión de la reivindicación 36, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC. ID N°: 7.
38. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 37, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc causa menos de 10% de aumento de masa del músculo esquelético en el paciente.
- 10 39. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc está destinada a ser administrada de modo de alcanzar una concentración sérica en el paciente de al menos 0.2 pg/kg.
40. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 7.
- 15 41. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 40, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una vida media sérica entre 15 y 30 días.
- 20 42. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se administra al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por semana.
43. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se administra al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por mes.
- 25 44. Un polipéptido que comprende la SEC. ID N°: 7.
45. Un polipéptido soluble de acuerdo con la reivindicación 44.
46. Un polipéptido que se une a activina de acuerdo con la reivindicación 45.
- 30 47. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46 que se une a activina con una K_D menor de 1 micromolar.
48. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 47 que se une a activina con una K_D menor de 100 nanomolar.
- 35 49. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 48 que se une a activina con una K_D menor de 10 nanomolar.
50. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 49 que se une a activina con una K_D menor de 1 nanomolar.
- 40 51. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es al menos 95% puro.
52. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 51 que es al menos 98% puro.
53. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 51 que es acetilado.
- 45 54. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es carboxilado.
55. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es glucosilado.
56. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es fosforilado.
- 50 57. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que está unido a una porción lipídica.
58. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es acilado.
- 55 59. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que comprende polietilenglicol.
60. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que comprende un lípido.
61. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que comprende un fosfato.
- 60 62. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que comprende un polisacárido.
63. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que comprende monosacárido.

- 64. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es PEGilado.
- 65. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es farnesilado.
- 5 66. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que es biotinilado.
- 67. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 44 que está conjugado a un agente de derivación orgánico.

Figura 1

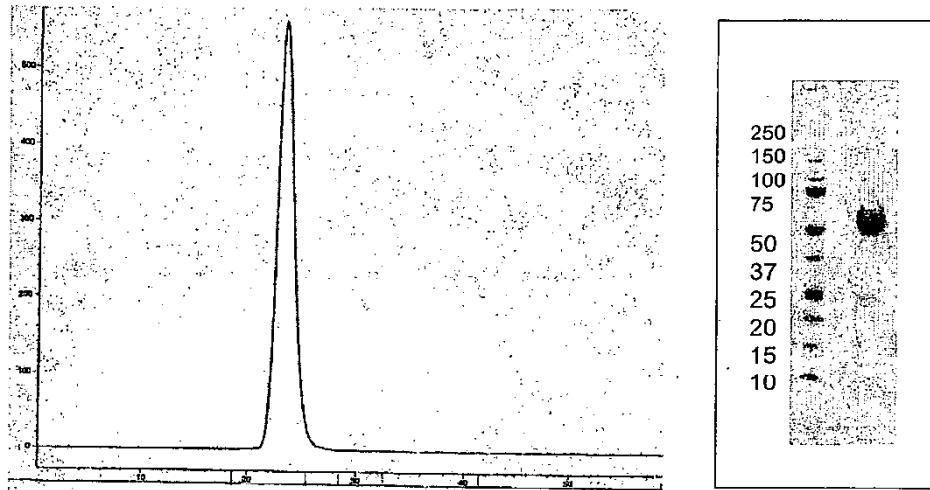


Figura 2

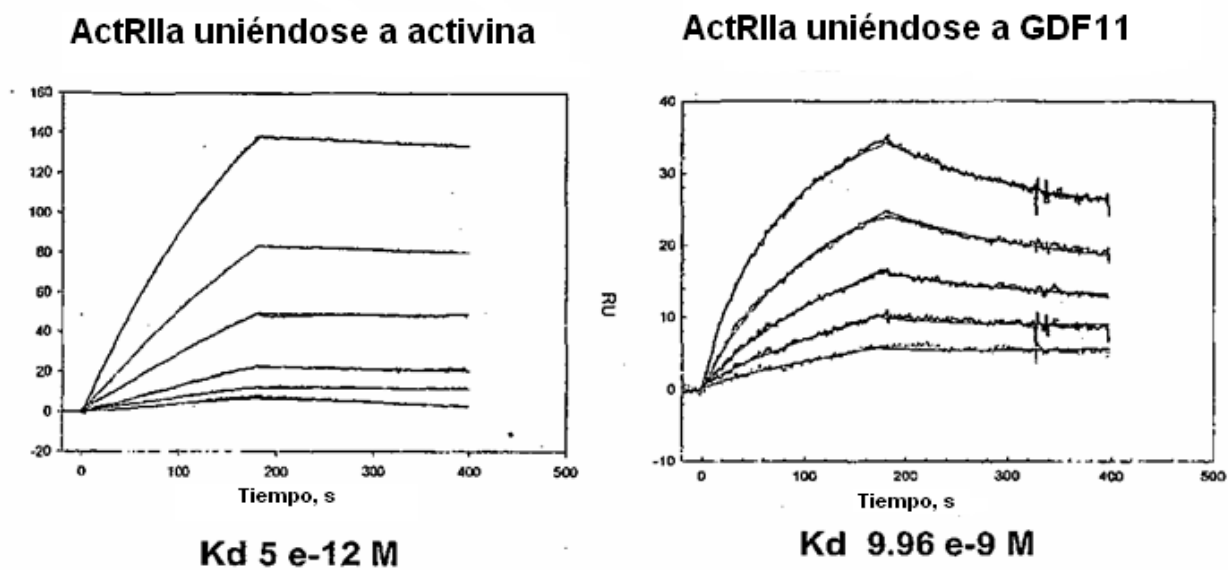


Figura 3

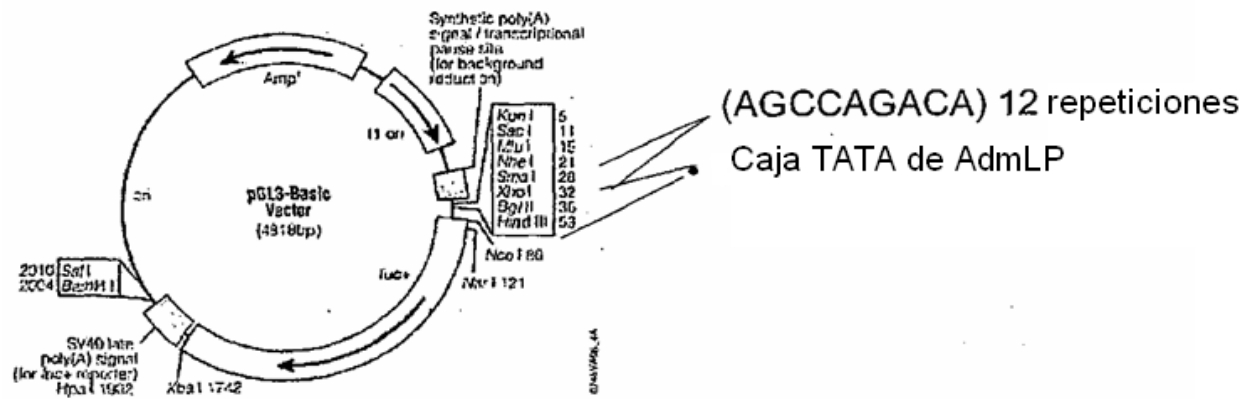


Figura 4

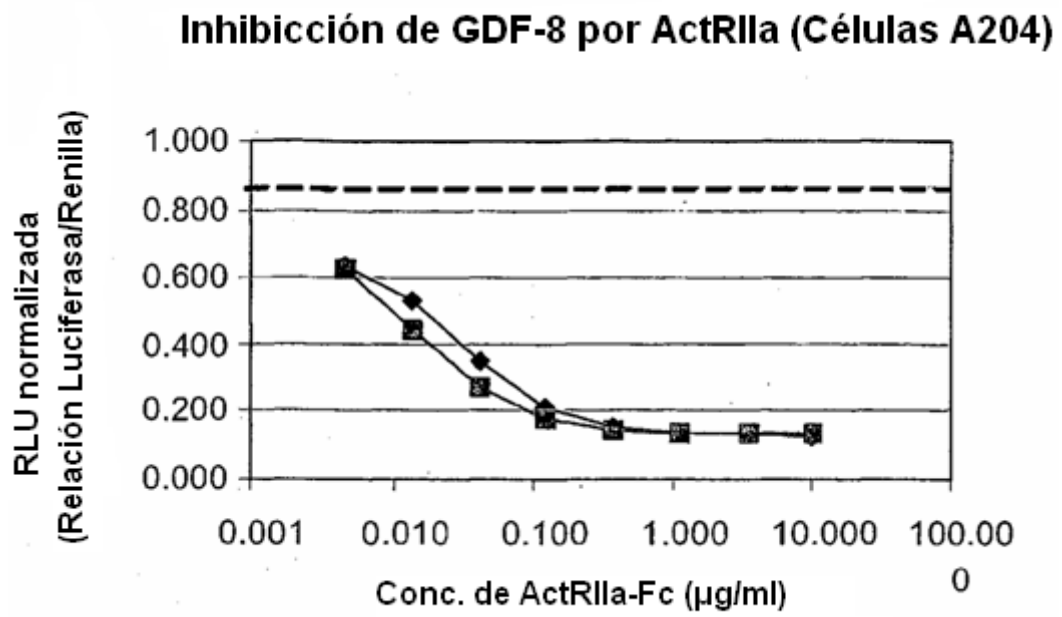


Figura 5

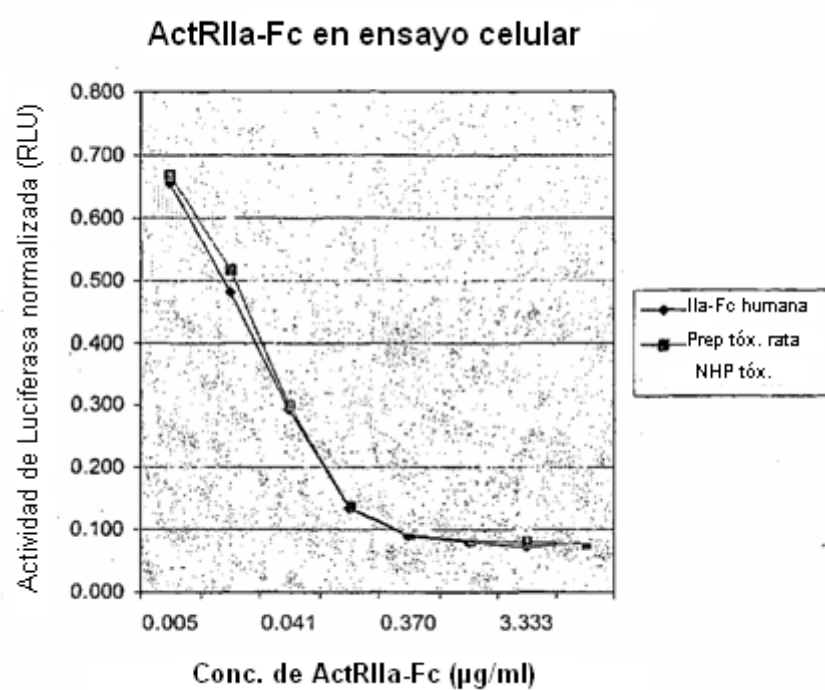


Figura 6

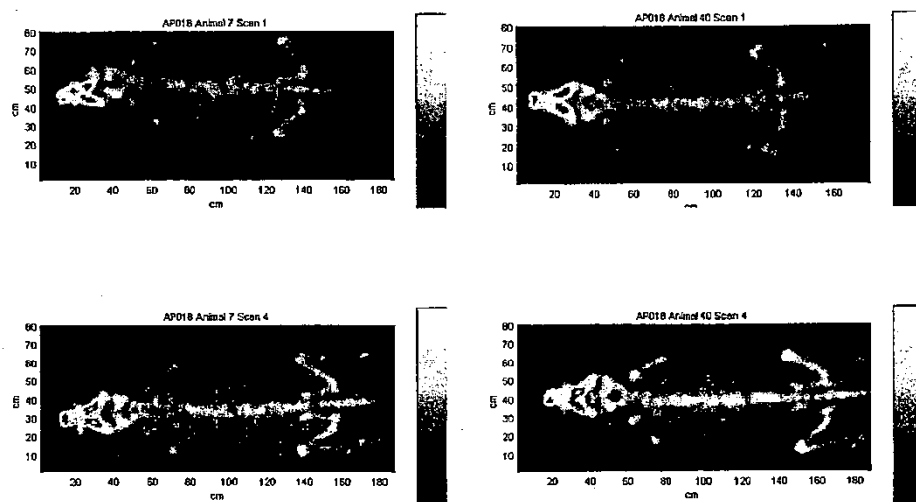


Figura 7

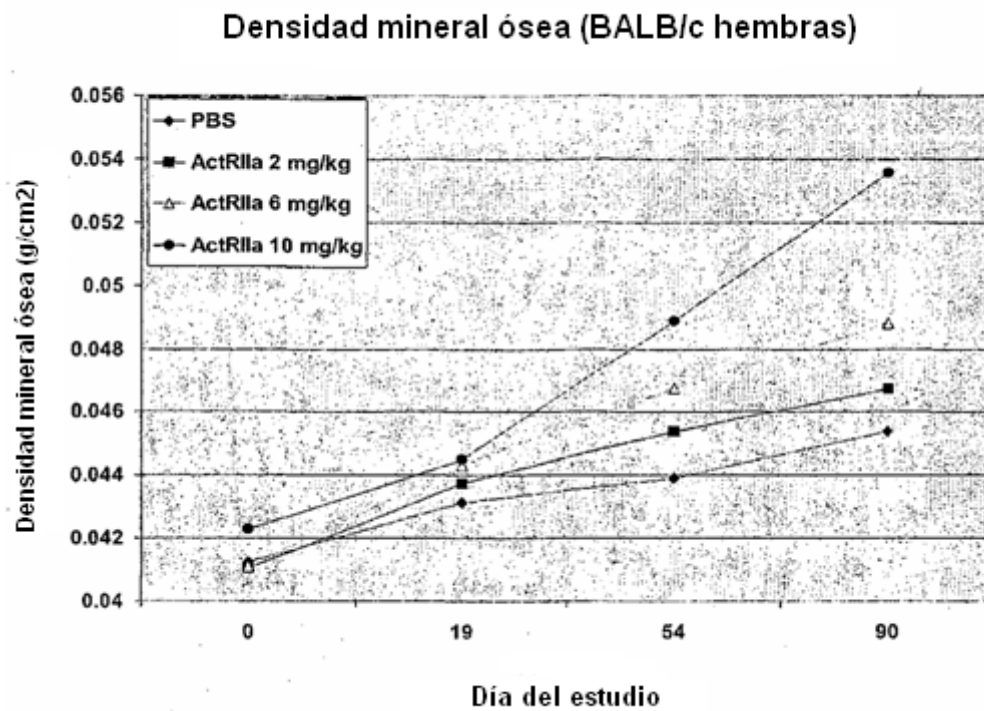


Figura 8

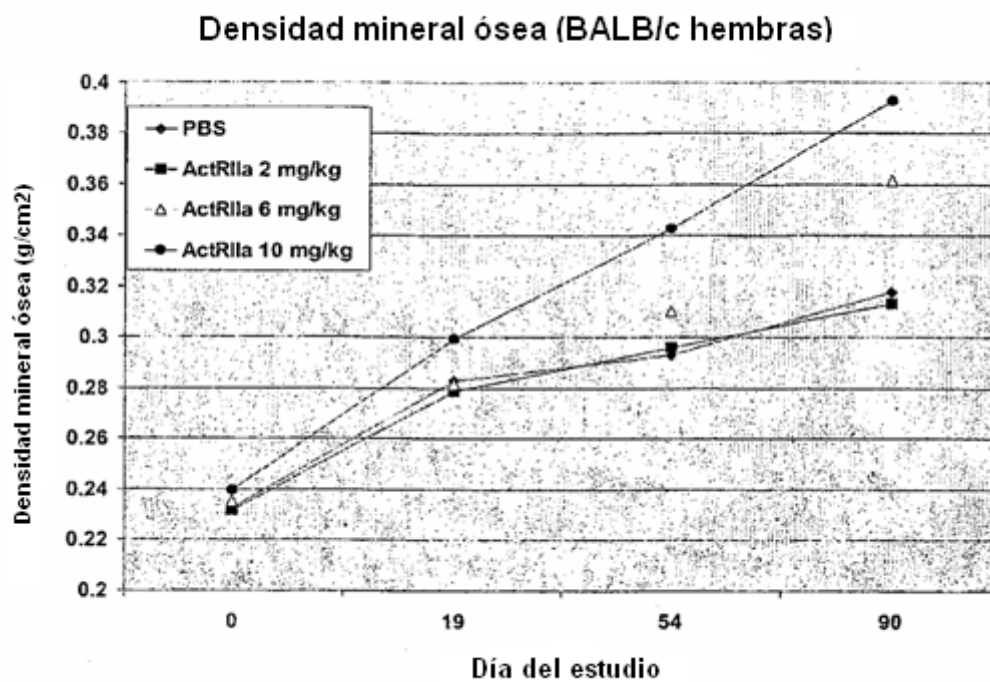


Figura 9

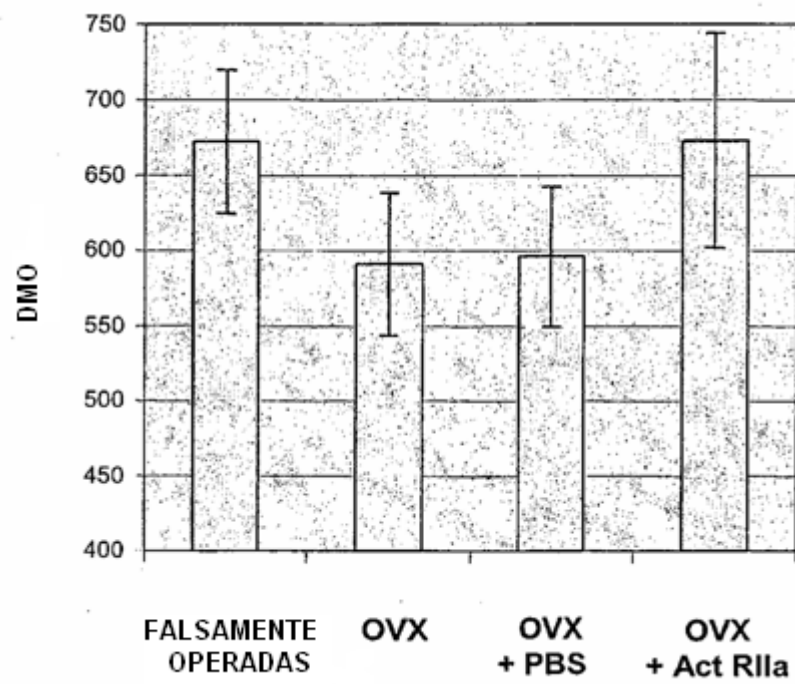


Figura 10

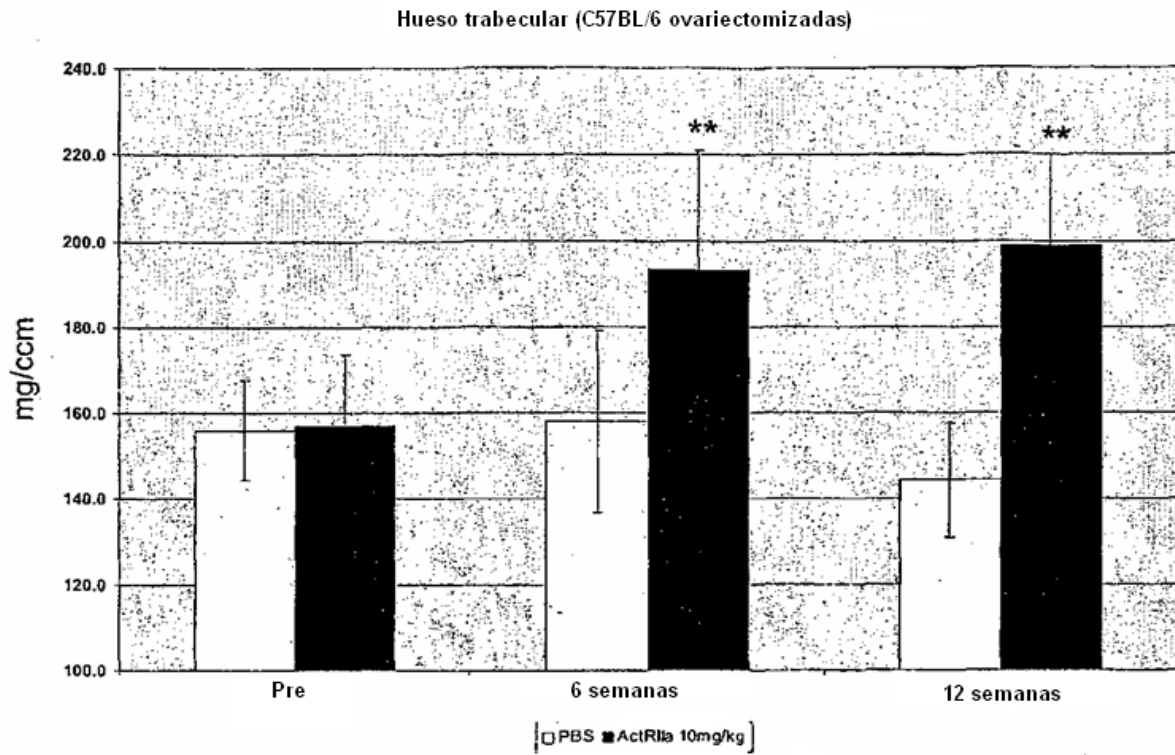


Figura 11

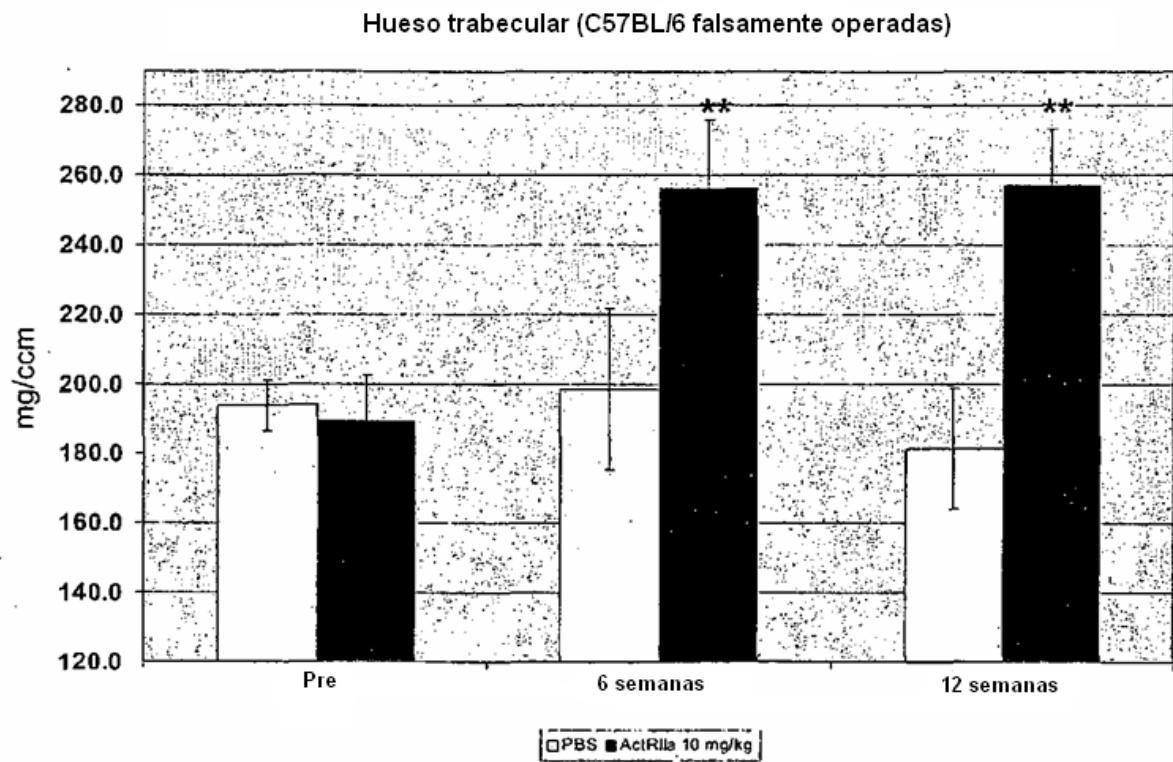


Figura 12

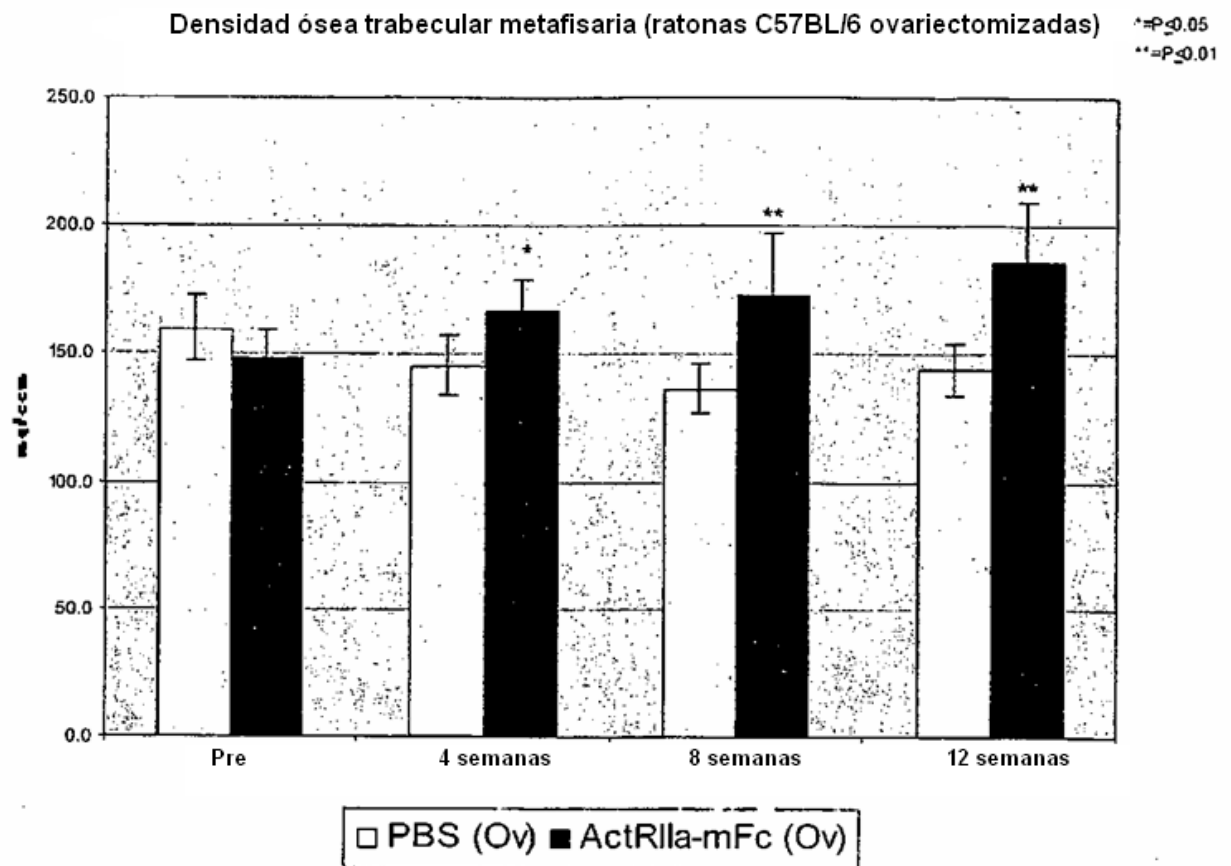


Figura 13

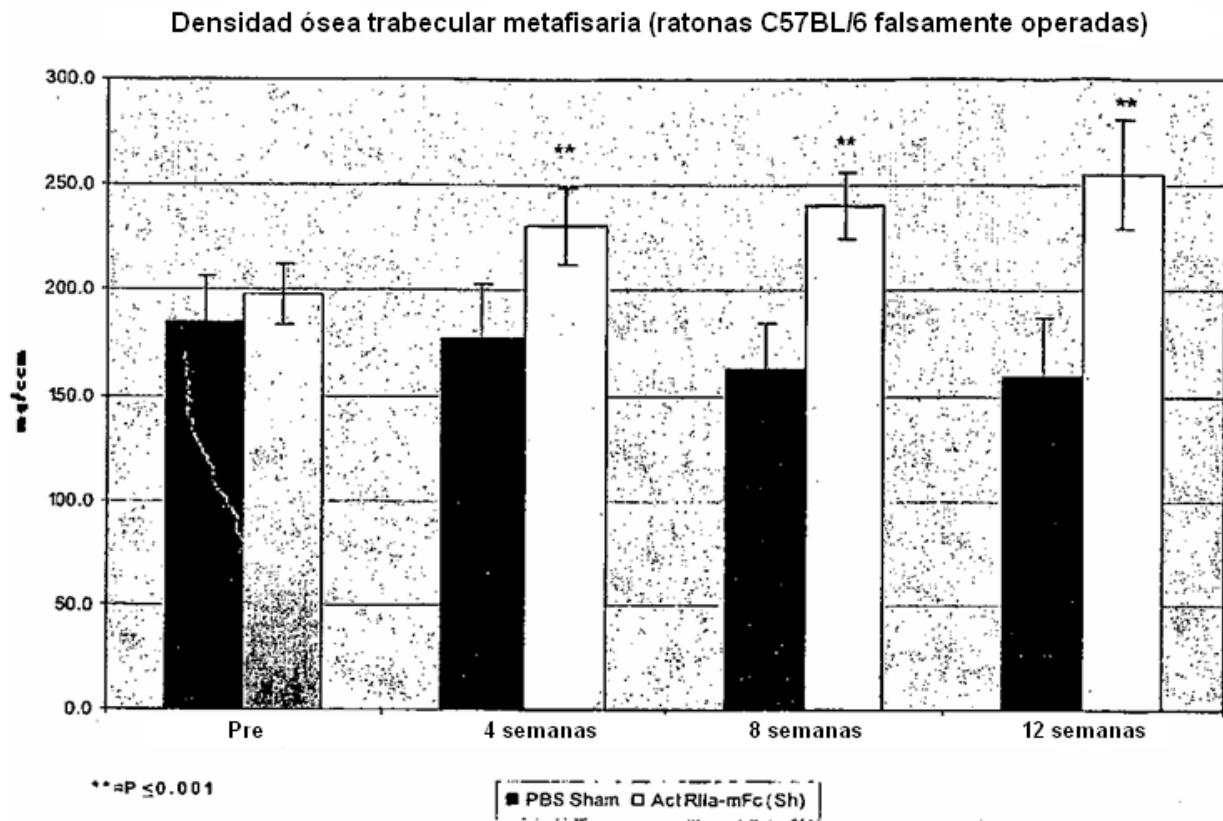


Figura 14

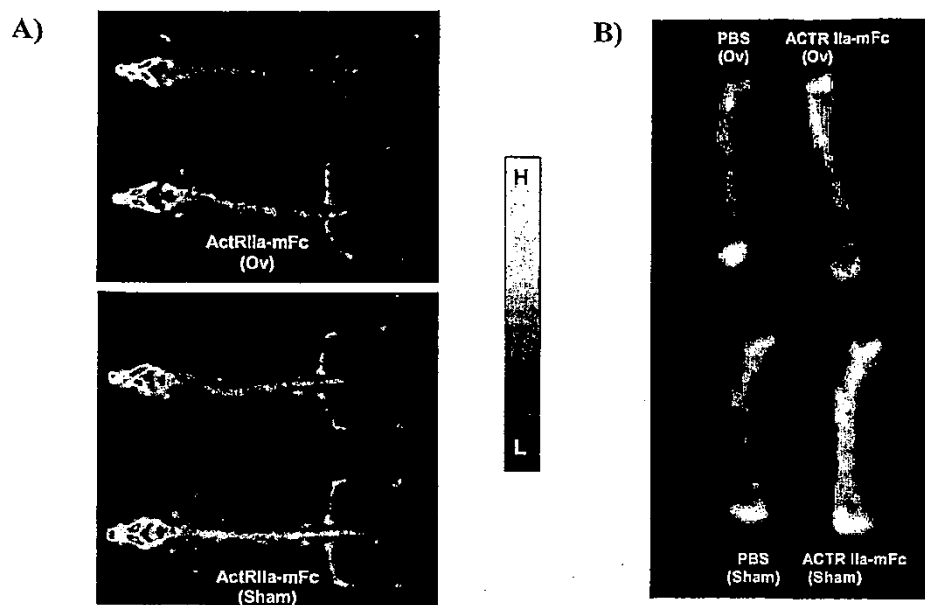


Figura 15

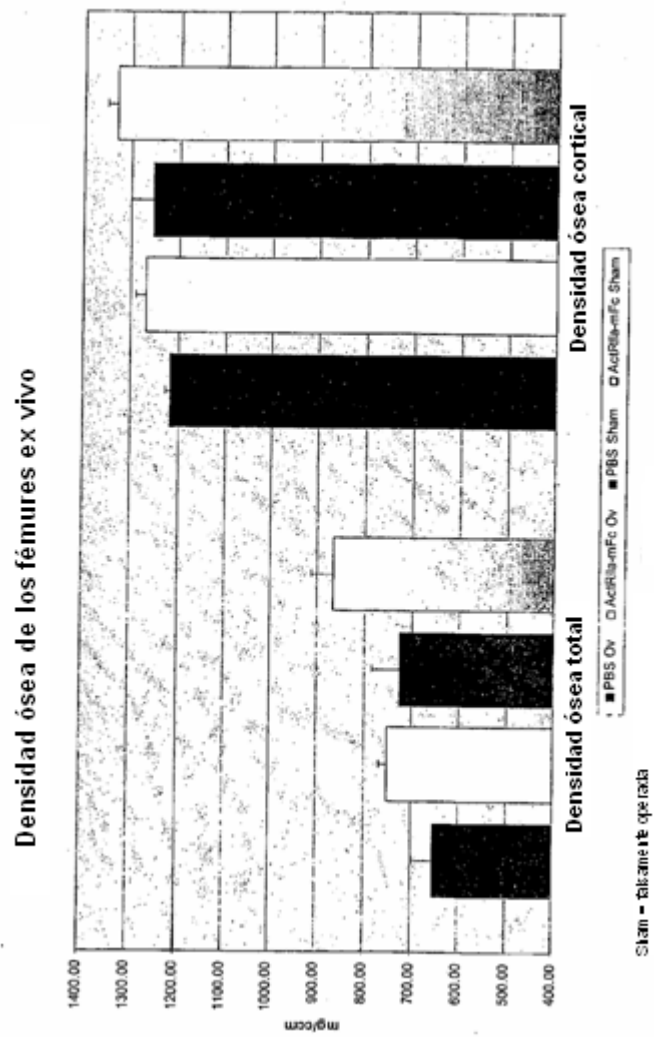


Figura 16

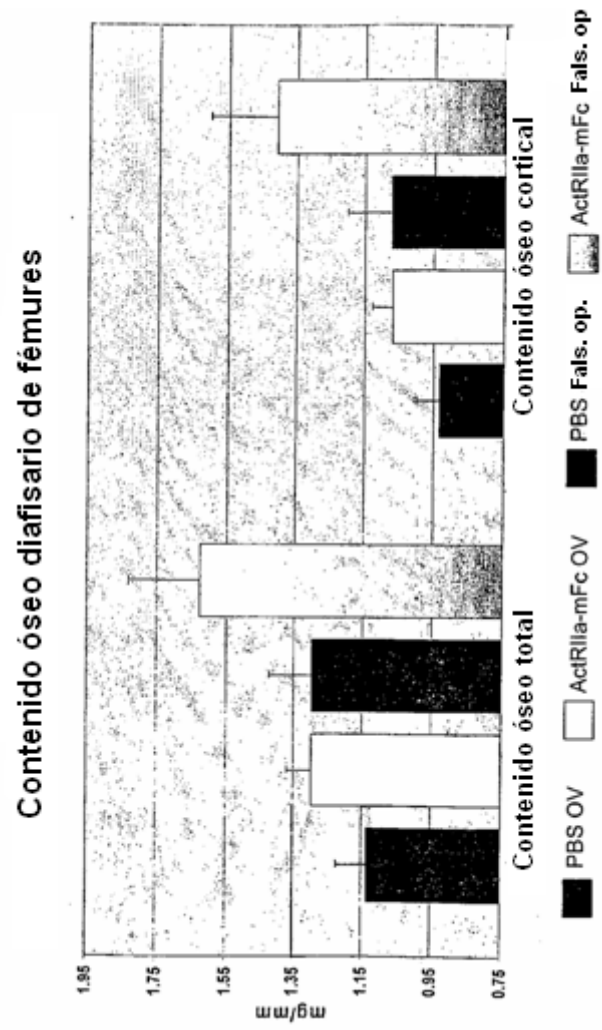


Figura 17

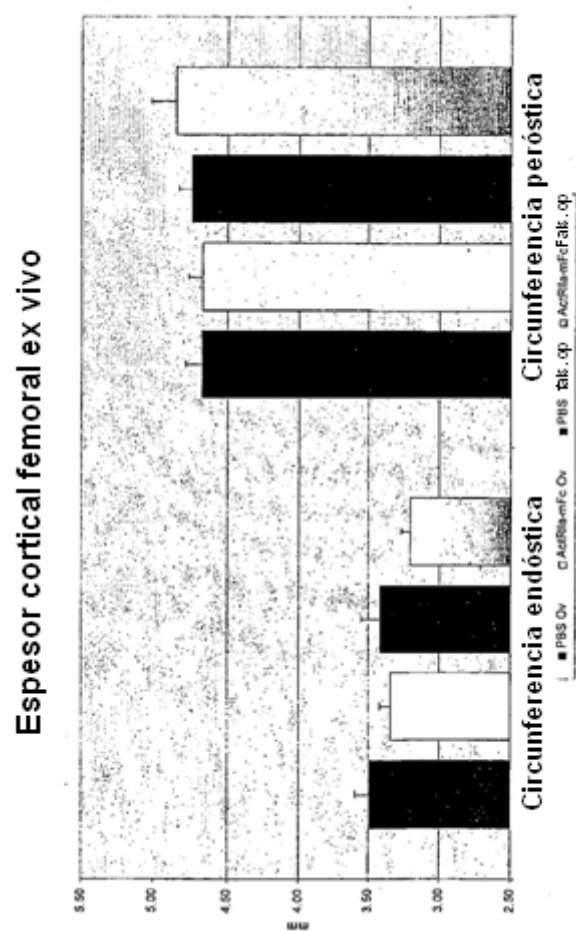


Figura 18

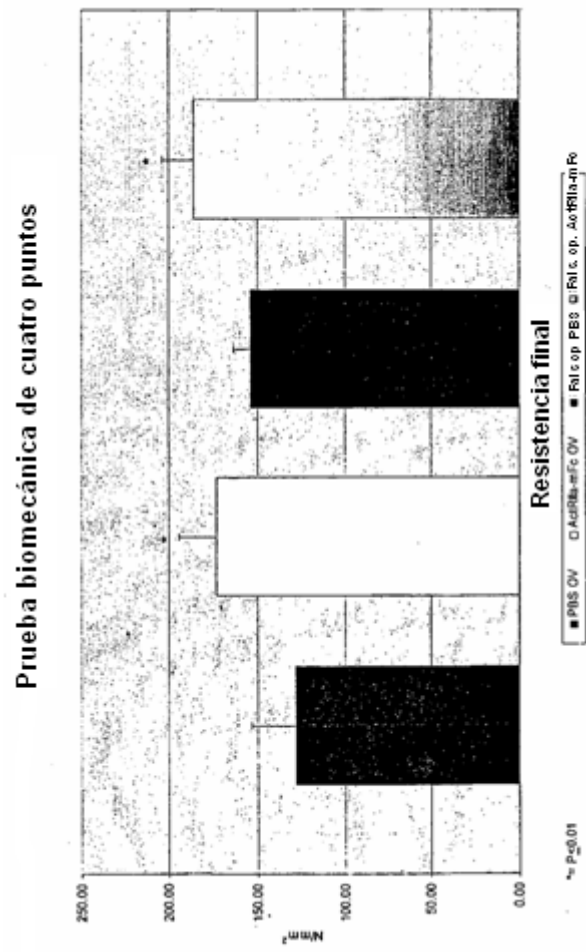
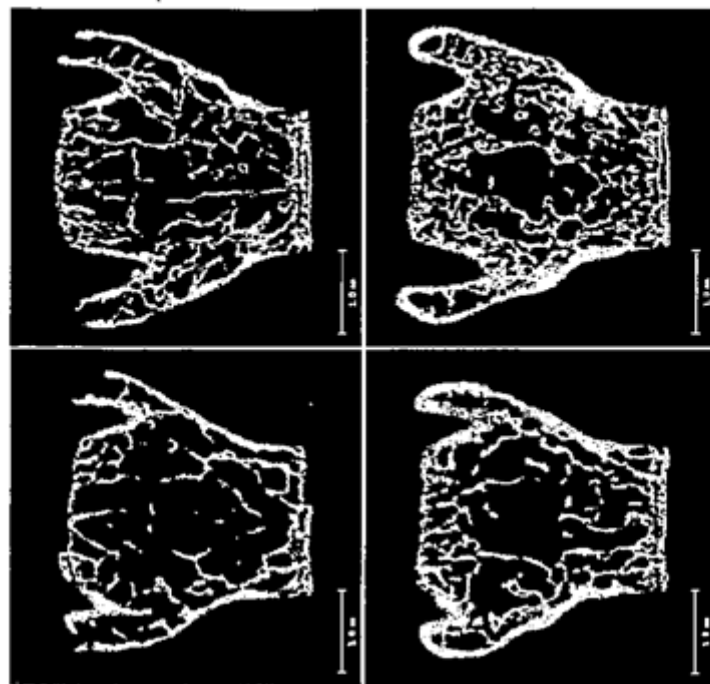


Figura 19



datos de micro TC que se muestran al fin del estudio
edad (24 semanas)

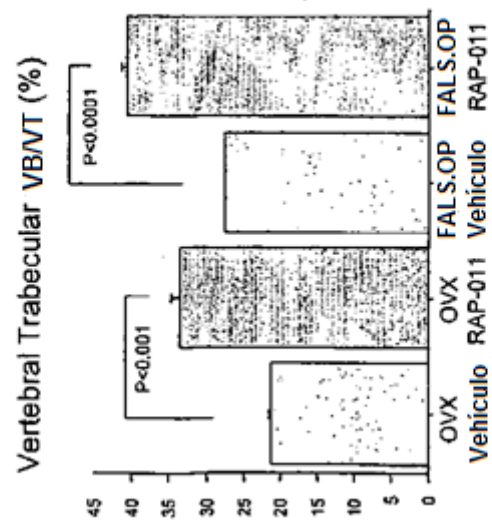


Figura 20

	OVX-VEH	OVX-RAP-011	FALS.OP-VEH	FALS.OP-RAP-011
				
@ 12 semanas	OVX-VEH	OVX-RAP-011	FALS.OP-VEH	FALS.OP-RAP-011
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 **
Conn D (mm ⁻³)	8.4 ± 6	85.1 ± 13.7 **	41.4 ± 14.8	131.2 ± 16.5 **

** p<0.01 vs VEH

Figura 21

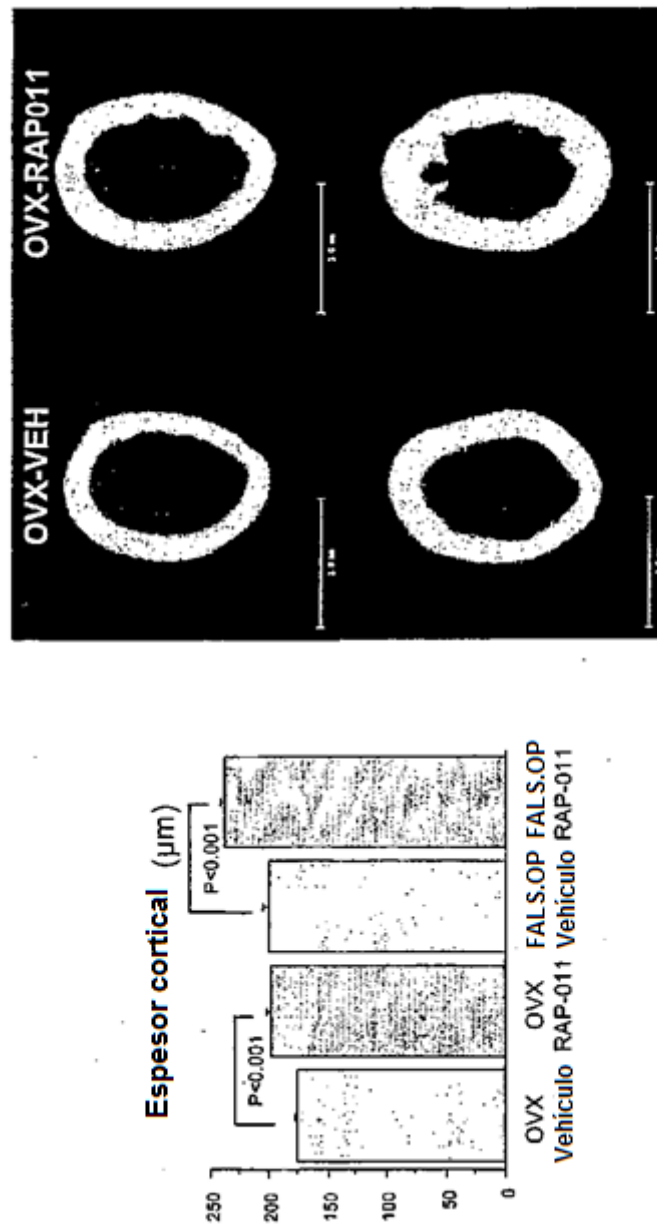


Figura 22

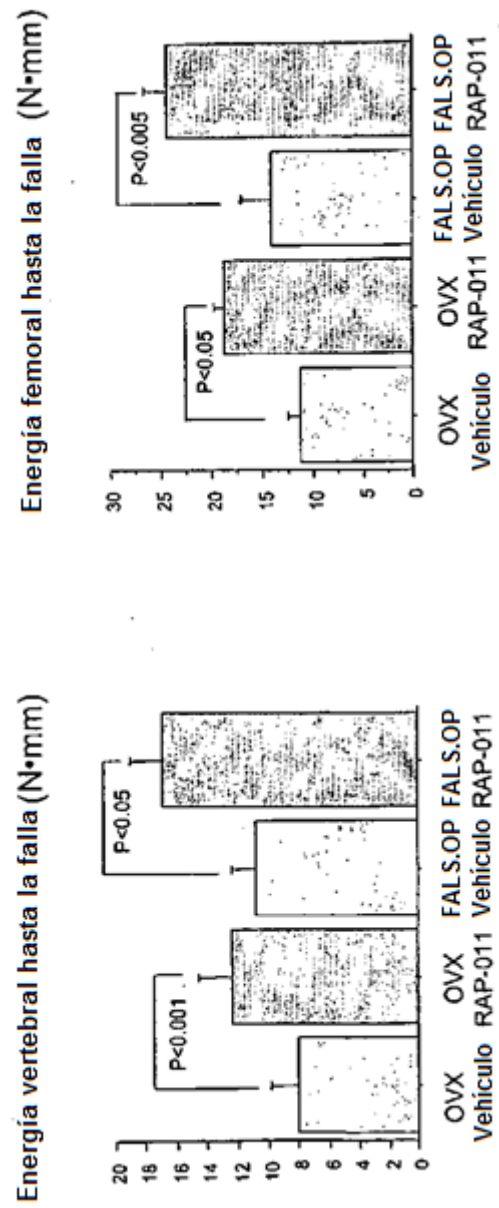


Figura 23

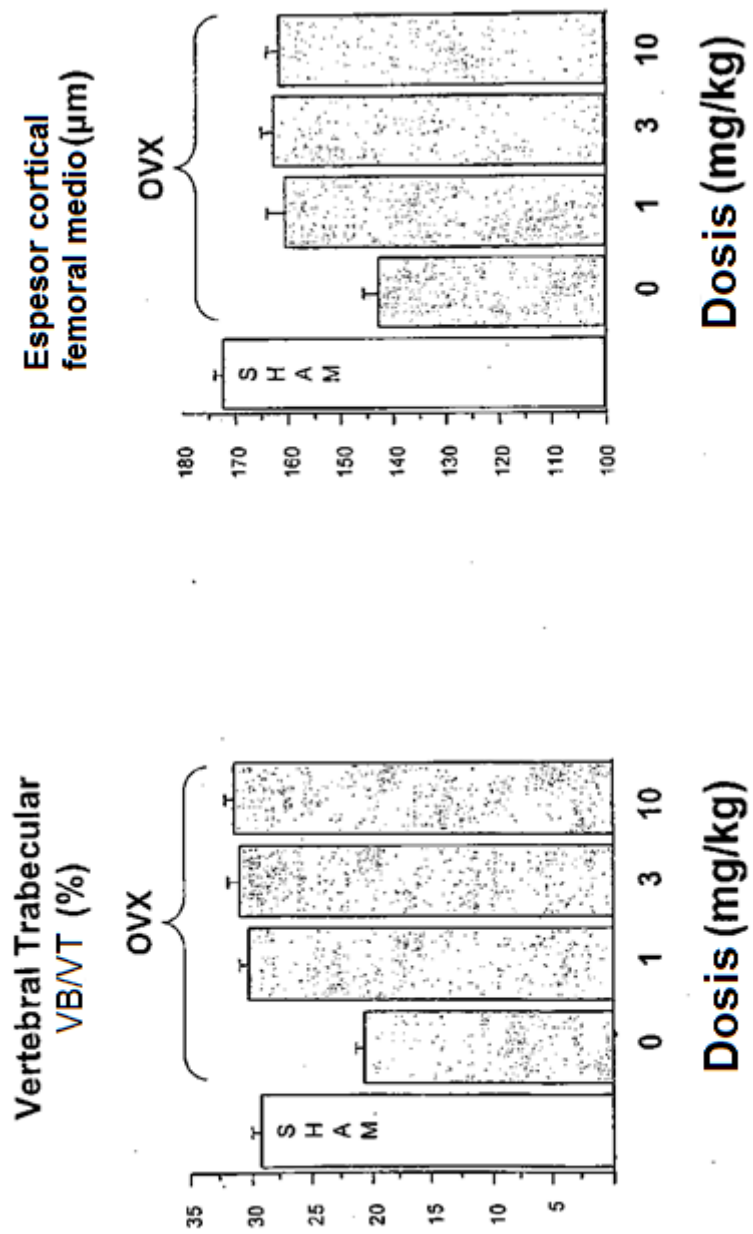


Figura 24

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