

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 666**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/04** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 08725118 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2111229**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de Activina-ActR1IIa para uso en la prevención o el tratamiento de metástasis de cáncer de mama o pérdida ósea relacionada con el cáncer de mama**

30 Prioridad:

**01.02.2007 US 899070 P**

**25.10.2007 US 540 P**

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

**26.07.2013**

73 Titular/es:

**ACCELERON PHARMA, INC. (100.0%)**

**128 SIDNEY STREET**

**CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**KNOPF, JOHN;**

**SEEHRA, JASBIR y**

**KUMAR, RAVINDRA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 415 666 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de Activina-ActRIIa para uso en la prevención o el tratamiento de metástasis de cáncer de mama o pérdida ósea relacionada con el cáncer de mama.

## Antecedentes de la invención

5 El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres de los países occidentales y afecta a más de 180.000 mujeres cada año en los EE. UU. La enfermedad surge en la glándula mamaria, que se compone de un sistema de conductos ramificados. Cada glándula mamaria o mama contiene de 15 a 20 secciones llamadas lóbulos, y cada lóbulo contiene una serie de conductos ramificados que llegan hasta el pezón. Las células epiteliales que recubren cada conducto son responsables de la producción de leche. Se cree que el cáncer de mama invasivo se origina en el epitelio normal de la unidad lobulillar ductal terminal a través de una serie de lesiones proliferativas cada vez más anómalas. Una vez que el tumor adquiere la capacidad de metastatizarse, las células cancerosas de la mama se extienden a otros órganos, lo cual hace que el tratamiento sea cada vez más difícil. Los sitios más comunes de metástasis del cáncer de mama son el pulmón, el hígado y los huesos. Las metástasis en el hueso están asociadas comúnmente con dolor intenso, pérdida ósea y un mayor riesgo de fracturas. Muchas terapias antiestrogénicas utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama también se asocian con una pérdida ósea acelerada.

Los pacientes diagnosticados con cáncer de mama por lo general se someten a cirugía y/o radioterapia para tratar el tumor primario, seguida de terapia auxiliar para tratar las células cancerosas que se hayan podido diseminar a lugares distantes. La terapia auxiliar consiste en quimioterapia citotóxica y/o terapia endocrina. Aunque la quimioterapia ha sido eficaz en el tratamiento de diversos tipos de tumores malignos, muchos compuestos antineoplásicos inducen efectos secundarios indeseables. Además, muchos tumores o bien no responden o se vuelven resistentes a la quimioterapia y a las terapias endocrinas. Aunque la terapia auxiliar ha mejorado la tasa de mortalidad entre los pacientes con cáncer de mama, la tasa de supervivencia de 10 años para pacientes con los tipos histopatológicos más comunes de cáncer de mama invasivo sigue siendo solo de 35-50% (Weigelt *et al.* 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602). Además, debido a unos criterios de pronóstico insuficientes, muchas mujeres que se hubieran podido curar solo con un tratamiento local, reciben innecesariamente terapia auxiliar.

En consecuencia, se necesitan dianas moleculares más eficientes y eficaces contra el cáncer de mama. Las terapias alternativas que sean menos tóxicas y/o más eficaces que la quimioterapia y las terapias endocrinas podrían mejorar los regímenes de tratamiento y aumentar la supervivencia. Además, los agentes que se puedan utilizar como tratamientos preventivos para pacientes que pueden tener riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo o metastásico serían útiles en el ambulatorio. Es un objeto de la presente descripción, por lo tanto, proporcionar composiciones y métodos alternativos para el tratamiento del cáncer de mama o para inhibir o prevenir la progresión del cáncer de mama en pacientes.

## Compendio de la invención

35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un antagonista de activina-ActRIIa, para uso en el tratamiento o la prevención de la metástasis del cáncer de mama o la pérdida ósea asociada con el cáncer de mama, en un sujeto que lo requiera, en donde el antagonista de activina-ActRIIa es una proteína de fusión ActRIIa-Fc que comprende un polipéptido seleccionado entre:

- 40 a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;
- b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;
- c. un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2;
- d. un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3;
- 45 e. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12;
- f. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12; y
- g. un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 12.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un antagonista de activina-ActRIIa para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de metástasis de cáncer de mama o pérdida ósea relacionada con el cáncer de mama, en un sujeto, en donde el antagonista de activina-ActRIIa es una proteína de fusión ActRIIa-Fc que comprende un polipéptido seleccionado entre:

- a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;
- b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;
- 5 c. un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2;
- d. un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3;
- e. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12;
- 10 f. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12; y
- g. un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 12.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes en esta memoria.

- 15 En parte, la presente invención se refiere al uso de ciertos antagonistas de la activina, así como a antagonistas de ActRIIa, para tratar o prevenir las metástasis de cáncer de mama o la pérdida ósea asociada con el cáncer de mama.

20 Las proteínas de fusión ActRIIa-Fc se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprende la proteína de fusión ActRIIa-Fc que se une a la activina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La proteína de fusión ActRIIa-Fc que se une a la activina puede unirse a la activina con una  $K_D$  inferior a 1 micromolar o inferior a 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, la proteína de fusión ActRIIa-Fc que se une a la activina se une selectivamente a la activina frente a GDF11 y/o GDF8 y, opcionalmente, 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. Aunque no se desea vincularse a ningún mecanismo de acción particular, se espera que este grado de selectividad para la inhibición de la activina sobre la inhibición de GDF11/GDF8 justifique los efectos sobre el hueso o la supervivencia o el crecimiento tumoral sin un efecto cuantificable constante sobre el músculo. En muchas realizaciones, una proteína de fusión ActRIIa-Fc se seleccionará para causar menos de 15%, menos de 10% o menos de 5% de aumento en el músculo, con dosis que logran efectos deseables sobre las células cancerosas. La composición puede tener una pureza de al menos 95%, con respecto a otros componentes polipeptídicos, tal y como se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño y, opcionalmente, la composición tiene una pureza de al menos 98%. Una proteína de fusión ActRIIa-Fc que se une a la activina para uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de las descritas en este documento, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 2, 3, 7 o 12, o que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 12 o 13.

35 Una proteína de fusión ActRIIa-Fc soluble que se une a la activina puede incluir una o varias alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio que se une al ligando) en relación con un polipéptido ActRIIa de origen natural. Algunos ejemplos de polipéptidos ActRIIa alterados se proporcionan en el documento WO 2006/012627, págs. 59-60. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede alterar, por ejemplo, la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, insecto u otro tipo de célula eucariota, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en comparación con el polipéptido ActRIIa de origen natural.

40 En una realización preferida, una proteína de fusión ActRIIa-Fc comprende un enlazador relativamente no estructurado situado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIa. Este enlazador no estructurado se puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIa (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o una extensión de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que está relativamente exenta de estructura secundaria, o una mezcla de ambas. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede contener, por ejemplo, una única secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones de TG<sub>4</sub> o SG<sub>4</sub>). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un epítipo marcador, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST. Opcionalmente, una proteína de fusión ActRIIa-Fc soluble incluye uno o varios residuos de aminoácidos modificados, seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente orgánico derivatizante. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o varios compuestos adicionales, tales como un compuesto que se utiliza para el tratamiento de un trastorno óseo. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente exenta de pirógenos. En general, es preferible que una proteína ActRIIa se exprese en una línea celular de mamífero que medie de forma adecuada en la glicosilación natural de la proteína ActRIIa, con el fin de disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han empleado con éxito líneas celulares humanas y CHO, y se espera que otros sistemas de expresión comunes de

mamíferos sean útiles. Además, tipos celulares de levadura y otros han sido alterados genéticamente para expresar enzimas de mamífero que catalizan la glicosilación, de este modo se permite la generación de una glicosilación muy controlada similar a la de mamíferos, sobre proteínas expresadas en estas células que no son de mamíferos. Estas líneas celulares recombinantes también se pueden utilizar para expresar las proteínas descritas en este documento.

- 5 Tal y como se describen en este documento, las proteínas ActRIIa denominadas ActRIIa-Fc (una forma con un enlazador mínimo entre la porción ActRIIa y la porción Fc) tienen propiedades deseables, que incluyen una unión selectiva a la activina frente a GDF8 y/o GDF11, una unión de alta afinidad con el ligando y una semivida en suero superior a dos semanas en modelos animales.

10 En esta memoria se describen métodos para tratar o prevenir el cáncer de mama usando ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIa soluble que se une a activina. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido ActRIIa soluble que se une a activina, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio que se une al ligando) de un ActRIIa y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembranal y/o el dominio citoplásmico de un ActRIIa, pero un codón de detención situado dentro del dominio transmembranal o del dominio citoplásmico, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembranal o el dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia polinucleotídica de ActRIIa de longitud completa, tal como SEQ ID NO: 4 o 5, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo adicionalmente dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción, al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3'-terminal o situado en otro lugar, de tal manera que la traducción del polinucleótido da lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente con una porción truncada de un ActRIIa de longitud completa. Una secuencia de ácido nucleico preferida es SEQ ID NO: 14. Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden estar ligados funcionalmente a un promotor para la expresión, y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

25 También se describen en esta memoria métodos para preparar un polipéptido ActRIIa soluble que se une a activina y que se puede utilizar para prevenir el cáncer de mama. Tal método puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5 o 14) descritos en este documento en una célula adecuada, tal como una célula CHO. Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIa soluble, en donde dicha célula se transforma con una estructura artificial de expresión de ActRIIa soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRIIa soluble así expresado. Los polipéptidos ActRIIa solubles se pueden recuperar como fracciones sin purificar, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación puede lograrse mediante una serie de etapas de purificación, que incluyen, por ejemplo, una, dos o tres o más de las siguientes técnicas, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, sefarsa Q), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, fenilsefarsa), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico.

40 Un antagonista de activina-ActRIIa descrito en este documento, tal como un polipéptido ActRIIa soluble que se une a la activina, se puede usar en un método para el tratamiento, la prevención o la inhibición del cáncer de mama en un sujeto, incluidos, por ejemplo, métodos para retrasar la aparición del cáncer de mama, inhibir la progresión del cáncer de mama, reducir el tamaño del tumor, evitar el crecimiento del tumor, retrasar la aparición de metástasis o prevenir una metástasis, incluida una metástasis en el hueso. En esta memoria se describen métodos para disminuir o inhibir el crecimiento o la supervivencia de células de cáncer de mama en pacientes que lo requieran. Un método puede comprender administrar a un sujeto que lo requiera una cantidad eficaz de antagonista de activina-ActRIIa. También se describen usos de antagonistas de activina-ActRIIa para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, tal y como se describen en este documento, así como terapias combinadas que comprenden un antagonista de activina-ActRIIa y radioterapia, quimioterapia (por ejemplo, un agente citotóxico) y/o terapia endocrina. El antagonista puede ser una proteína de fusión ActRIIa-Fc, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

50 Se pueden proporcionar métodos para prevenir o retrasar la aparición del cáncer de mama en pacientes con uno o más factores de riesgo de cáncer de mama. En algunas realizaciones, la invención se refiere a la prevención o el retraso de la aparición de una enfermedad metastásica en pacientes a los que ya se les ha diagnosticado un tumor de mama primario o una lesión proliferativa de la mama. Esto se puede conseguir administrando a un paciente humano que lo requiera una cantidad eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 2; b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 3; y c) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados a partir de SEQ ID NO: 2.

60 En esta memoria se describe un método para inhibir la señalización mediada por activina en un paciente humano con cáncer de mama. El método puede comprender administrar al paciente humano una cantidad eficaz de un antagonista de activina-ActRIIa. En otras realizaciones, el antagonista es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 2; b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID

NO: 3; y c) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados a partir de SEQ ID NO: 2.

5 En esta memoria se describe un método para identificar un agente que inhibe el crecimiento o la supervivencia de células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de mama). El método comprende: a) la identificación de un agente de ensayo que se une a la activina o un dominio que se une a un ligando de un polipéptido ActR11a; y b) la evaluación del efecto del agente sobre la proliferación, la supervivencia o la apoptosis de las células cancerosas.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra la purificación de ActR11a-hFc expresado en células CHO. La proteína se purifica como un pico único, bien definido, tal y como se visualiza en la columna de exclusión molecular (panel izquierdo) y SDS-PAGE teñido con Coomassie (panel derecho) (carril de la izquierda: patrones del peso molecular; carril de la derecha: ActR11a-hFc).

La Figura 2 muestra la unión de ActR11a-hFc a la activina y GDF-11, tal como se mide con un ensayo BiaCore®.

15 La Figura 3 muestra que el tratamiento con ActR11a-mFc reduce en gran medida la formación de lesiones metastásicas en un modelo de ratón de cáncer de mama metastásico. Los ratones fueron visualizados de forma no invasiva (formación de imágenes fluorescentes, anestesiados) cinco semanas después de una inyección intracardiaca de células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresaban luciferasa. 12/14 ratones tratados con vehículo muestran lesiones metastásicas visibles, mientras que solo 4/12 ratones tratados con ActR11a-mFc muestran lesiones visibles.

Descripción detallada de la invención

## 20 1. Generalidades

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Existe constancia de que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos celulares en vertebrados e invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos, y pueden influir sobre una variedad de procesos de diferenciación, que incluyen la adipogénesis, la miogénesis, la condrogénesis, la cardiogénesis, la hematopoyesis, la neurogénesis y la diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: la rama BMP/GDF y TGF-beta/Activina, cuyos miembros tienen diversos efectos, frecuentemente complementarios. Mediante la manipulación de la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, es posible frecuentemente causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado azul belga y piomontesa son portadoras de una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también denominado miostatina), que causa un gran incremento en la masa muscular. Grobet *et al.*, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Por otra parte, en los seres humanos, alelos inactivos de GDF8 se asocian con una masa muscular incrementada y, al parecer, una fuerza excepcional. Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

35 Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades  $\beta$  estrechamente relacionadas ( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$  y  $\beta_A\beta_B$ , respectivamente). El genoma humano codifica también una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y también se conocen formas heterodiméricas que contienen  $\beta_C$  o  $\beta_E$ . En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células del ovario y la placenta, mantener la supervivencia de las células neuronales, influir positiva o negativamente sobre el progreso del ciclo celular dependiendo del tipo de célula e inducir la diferenciación del mesodermo, 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, se ha mostrado que la activina B está implicada en la regulación de la diferenciación de las células epiteliales mamarias en ratones (Robinson y Hennighausen, 1997 Development 124: 2701-2708). En varios tejidos, la señalización de la activina está antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) desde la pituitaria, la activina promueve la secreción y la síntesis de FSH, mientras que la inhibina evita la secreción y la síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o que se unen a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada con folistatina (FSRP) y  $\alpha_2$ -macroglobulina.

55 Las señales de TGF- $\beta$  están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina-cinasa de tipo I y de tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad posteriormente, después de la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores de tipo I y de tipo II son proteínas transmembranales, compuestas por un dominio extracelular que se une al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico con una especificidad prevista por serina/treonina. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores de tipo II son necesarios para la unión a ligandos y para la expresión de los receptores de tipo I. Los receptores de la activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión del ligando, lo cual da como resultado la fosforilación de los receptores de tipo

I a través de los receptores de tipo II.

Dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIa y ActRIIb, han sido identificados como los receptores de tipo II para las activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell, 65:973-982; Attisano *et al.*, 1992, Cell, 68:97-108). Además de las activinas, ActRIIa y ActRIIb pueden interactuar bioquímicamente con varias proteínas diferentes de la familia TGF- $\beta$ , que incluyen BMP-7, 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 de tipo I para las activinas, en particular para la activina A, y ALK-7 también puede servir como un receptor para activinas, en particular para la activina B.

Tal y como se describe en esta memoria, un polipéptido ActRIIa soluble (ActRIIas), que muestra una preferencia sustancial por la unión a la activina A, en comparación con otros miembros de la familia TGF-beta, tales como GDF8 o GDF11, se puede utilizar para tratar o prevenir un cáncer, en particular el cáncer de mama. Aunque no se desea vincularse a ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de ActRIIas esté causado principalmente por un efecto antagonista de la activina, dada la fuerte unión a activina (constante de disociación picomolar) mostrada por la estructura artificial ActRIIas en particular utilizada en estos estudios. Los antagonistas de activina-ActRIIa incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles que se unen a la activina, anticuerpos que se unen a la activina (particularmente a las subunidades A o B de la activina, también conocidas como  $\beta$ A o  $\beta$ B) y alteran la unión de ActRIIa, anticuerpos que se unen a ActRIIa y alteran la unión de la activina, proteínas que no son anticuerpos seleccionadas para la unión a activina o a ActRIIa (véanse, por ejemplo, los documentos WO/2002/088171, WO/2006/055689 y WO/2002/032925 para consultar ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y la selección de las mismas), péptidos aleatorios seleccionados para la unión a activina o a ActRIIa, fijados frecuentemente a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina o a ActRIIa, especialmente aglutinantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (por ejemplo, un receptor de activina soluble de tipo I) y de tipo II (por ejemplo, un receptor de activina soluble de tipo II), respectivamente, pueden estar ligadas entre sí para crear una molécula de unión bifuncional. Los aptámeros de ácidos nucleicos, moléculas de bajo peso molecular y otros agentes que inhiben el eje de señalización de activina-ActRIIa también se pueden usar. Diversas proteínas tienen actividad antagonista de activina-ActRIIa, incluida la inhibina (es decir, la subunidad alfa de la inhibina), a pesar de que la inhibina no contrarresta universalmente la activina en todos los tejidos, folistatina (por ejemplo, folistatina-288 y folistatina-315), FSRP, activina C, alfa(2)-macroglobulina y un mutante de la activina A M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). En general, las formas alternativas de la activina, en particular las que tienen alteraciones en el dominio de unión al receptor de tipo I, se pueden unir a los receptores de tipo II y no logran formar un complejo ternario activo, de este modo actúan como antagonistas. Además, ácidos nucleicos, tales como moléculas no codificantes, ARNip o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, en particular, la expresión de ActRIIa, se pueden utilizar como antagonistas de activina-ActRIIa. El antagonista de activina-ActRIIa que se va a utilizar puede mostrar selectividad para inhibir la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11. Las proteínas ActRIIb solubles se unen a la activina, sin embargo, la proteína de tipo natural no muestra una selectividad significativa en la unión a la activina frente a GDF8/11. No obstante, tales polipéptidos ActRIIb, así como las formas alteradas de ActRIIb con diferentes propiedades de unión (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/012627, págs. 55-59) pueden lograr los efectos deseados sobre las células cancerosas. ActRIIb natural o alterado puede proporcionar una especificidad añadida por la activina, mediante el acoplamiento con un segundo agente de unión, selectivo de activina.

Los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se utiliza cada término. Ciertos términos se describen a continuación o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una orientación adicional al profesional para describir las composiciones y los métodos de la invención y la manera de prepararlos y su utilización. El alcance o el significado de cualquier uso de un término será evidente por el contexto específico en el que se utiliza el término.

"Alrededor" y "aproximadamente" significan generalmente un grado aceptable de error para la magnitud medida, dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10% y más preferiblemente dentro del 5% de un valor determinado o un intervalo de valores.

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

Las secuencias se pueden comparar entre sí, lo cual incluye desde la secuencia de tipo natural hasta una o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas y/o algoritmos de alineación de secuencias que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o una eliminación de

residuos, la alineación de las secuencias presentará un "hueco" (por lo general representado por un guión o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

"Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluidas proteínas procedentes de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas procedentes de diferentes especies de organismos. Tales proteínas (y los ácidos nucleicos que las codifican) tienen homología de secuencia, como refleja 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, se refiere al grado de identidad o de correspondencia entre secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos que pueden compartir o no un origen evolutivo común.

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

La expresión "cáncer de mama" se refiere a cualquier lesión proliferativa o anomalía proliferativa de la mama que incluye, por ejemplo, lesiones benignas, lesiones premalignas y malignas, tumores sólidos, y enfermedad metastásica (tanto localmente metastásica, por ejemplo, estadio III, como metastásica más generalizada, por ejemplo, estadio IV). El cáncer de mama incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio. El cáncer de mama también se refiere a una enfermedad en otros órganos, tales como pulmón, hígado y hueso, que se ha originado a partir de una lesión metastásica en la mama. El cáncer de mama también incluye los cánceres sensibles a hormonas y los cánceres independientes de hormonas. En general, los cánceres de mama independientes de hormonas se caracterizan por la ausencia o la reducción de los niveles de receptores de estrógeno y/o de progesterona, y estos tipos de cáncer son típicamente resistentes al tratamiento con terapias antihormonales (especialmente antiestrogénicas). Los cánceres de mama también se clasifican basándose en la expresión de Her2, teniendo los tumores Her2<sup>+</sup> un pronóstico peor que los tumores Her2<sup>-</sup>.

## 2. Polipéptidos ActR11a

Tal y como se emplea en este documento, el término "ActR11a" se refiere a una familia de proteínas receptoras de la activina de tipo IIa (ActR11a), procedente de cualquier especie y a variantes obtenidas a partir de tales proteínas ActR11a mediante mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActR11a en este documento se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActR11a son generalmente proteínas transmembranales, compuestas por un dominio extracelular que se une al ligando, con una región rica en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina-cinasa prevista.

La expresión "polipéptido ActR11a" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActR11a, así como variantes de los mismos (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO/2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActR11a incluyen polipéptidos obtenidos a partir de la secuencia de cualquier ActR11a conocido que tenga una secuencia que sea al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActR11a, y que opcionalmente sea al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% idéntica o superior. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a puede unirse e inhibir la función de una proteína ActR11a y/o activina. Un polipéptido ActR11a se puede seleccionar por la actividad para inhibir la proliferación celular o la supervivencia *in vivo* de células de cáncer. Los ejemplos de polipéptidos ActR11a incluyen el polipéptido precursor de ActR11a humano (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos ActR11a solubles humanos (por ejemplo, SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 12).

La secuencia proteica precursora de ActR11a humano es la siguiente:

**MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLEFFNANWEKDRTNQTGVPEP**  
**CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRTDCVEKKDSP**  
**EVYFCCCEGNNMCNEKFSYFPMEVETQPTSNPVTPKPPYYNILLSLVPL**  
**MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPVVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE**  
**VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN**  
**ILQFIGAEKRGTSVDVLDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE**  
**TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG**  
**ALKFEAGKSAGDTHGQVGRRYMAPEVLEGAINFORDAFLRIDMYAMGL**  
**VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEIIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVL**  
**RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT**  
**TEDIVTVVTVMTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)**

El péptido señal está subrayado una vez; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de

glicosilación ligada a N están doblemente subrayados.

La secuencia del polipéptido procesado (extracelular) de ActR1la soluble humano es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGD~~KDKRR~~HCFATWKNISG  
SIEIVKQGCWLD~~D~~INCYDR~~T~~DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP  
EM~~E~~VTQPTSNPVT~~P~~KPP (SEQ ID NO: 2)

5 Cabe señalar que la secuencia N-terminal que comienza con "ILG..." se ha determinado experimentalmente y difiere de la secuencia N-terminal "AIL..." que se propone comúnmente en la bibliografía. La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" delecionada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGD~~KDKRR~~HCFATWKNISG  
SIEIVKQGCWLD~~D~~INCYDR~~T~~DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP  
EM (SEQ ID NO:3)

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActR1la humano es la siguiente (los nucleótidos 164-1705 son de Genbank, número de entrada NM\_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTGCCGCTTTCTTATCTCCTGTCTTCAGGTGC  
TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG  
ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT  
TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTG  
GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG  
AAGTATATTTTGTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCA  
GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAA  
CATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATGCGGGGATTGTCATTGTGTCAT  
TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCCTCTGTAAGTTTCCAAGTCAAGAC  
CCAGGACCAACCCCACTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT  
GAAAGCAAGGGGAAAGATTTGGTGTGTCTGGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG  
CTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC  
AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTTCAATGGTGCGAAAAACGAGG  
CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACTAT  
CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAAGTGTGTCATATTGCAGAAACC  
ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA  
ACCTGCCATATCTCACAGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA  
CAGCTTGCATGTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC  
GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC  
TATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC  
TATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTAAGTGTGCTGACAGTGGACCTGTAGATGAATACATGTTG  
CCATTTGAGGAGGAAATGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT  
GCATAAAAAAAGAGGCTGTTTAAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA  
TGCTCTGTGAAACCATGAAGAATGTTGGGATCACGACGAGAGCCAGGTTATCAGCT  
GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA  
GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCTCCCAAGAATCTA  
10 GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

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

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA  
CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT  
GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGG  
CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA  
AGTATATTTTGTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAG  
AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID  
NO: 5)

Tal y como se describe en este documento, la expresión "polipéptido ActR11a soluble" se refiere en general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActR11a. La expresión "polipéptido ActR11a soluble", tal y como se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActR11a, así como cualquier variante de los mismos (incluidos mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActR11a que se une a la activina es uno que conserva la capacidad de unirse a la activina, incluida, por ejemplo, la activina AA, AB, BB, o formas que incluyen una subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido ActR11a que se une a la activina se unirá a la activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menor. El dominio extracelular de una proteína ActR11a se une a activina y es generalmente soluble, y por lo tanto se puede denominar un polipéptido ActR11a soluble que se une a activina. Los ejemplos de polipéptidos ActR11a solubles que se unen a la activina incluyen el polipéptido soluble ilustrado en SEQ ID NOS: 2, 3, 7, 12 y 13. SEQ ID NO: 7 se denomina ActR11a-hFc, y se describe adicionalmente en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActR11a solubles que se unen a la activina comprenden una secuencia señal, además del dominio extracelular de una proteína ActR11a, por ejemplo, la secuencia líder de melitina de la abeja melífera (SEQ ID NO: 8), el líder del activador tisular de plasminógeno (TPA) (SEQ ID NO: 9) o el líder natural de ActR11a (SEQ ID NO: 10). El polipéptido ActR11a-hFc ilustrado en SEQ ID NO: 13 utiliza un líder tPA.

Los fragmentos funcionalmente activos de los polipéptidos ActR11a pueden obtenerse mediante la detección de polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActR11a. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando métodos conocidos en la técnica, tales como la síntesis química convencional con f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (de forma recombinante o por síntesis química) y someter a ensayo para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActR11a o de la señalización mediada por la activina.

Las variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActR11a se pueden obtener analizando genotecas de polipéptidos modificados producidos de forma recombinante a partir de los ácidos nucleicos correspondientes mutagenizados que codifican un polipéptido ActR11a. Las variantes se pueden producir y someter a ensayo para identificar las que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActR11a o de la señalización mediada por activina. Una variante funcional de los polipéptidos ActR11a puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2 o 3.

Las variantes funcionales se pueden generar modificando la estructura de un polipéptido ActR11a 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*). Tales polipéptidos ActR11a modificados, cuando se seleccionan para conservar la unión a la activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActR11a de origen natural. Los polipéptidos ActR11a modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras), no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActR11a da como resultado un homólogo funcional, determinando la capacidad de la variante del polipéptido ActR11a para producir una respuesta en células de una manera similar a la del polipéptido ActR11a de tipo natural.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla emplear polipéptidos ActR11a que tienen mutaciones específicas que alteran la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones se pueden seleccionar a fin de introducir o eliminar uno o varios sitios de glicosilación, tales como los sitios de glicosilación ligados a O o ligados a N. Los sitios de reconocimiento de la glicosilación ligada a asparagina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (en donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por las enzimas adecuadas de glicosilación celular. La alteración también puede realizarse mediante la adición o la sustitución con uno o varios residuos de serina o treonina, en la secuencia del polipéptido ActR11a de tipo natural (para los sitios de glicosilación ligados a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o en ambas de las posiciones primera o tercera de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o la delección de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado una falta de glicosilación de la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidrato en un polipéptido ActR11a es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActR11a. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el(los) azúcar(es) puede(n) fijarse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. La eliminación de uno o más restos de carbohidratos presentes en un polipéptido ActR11a se puede conseguir por vía química y/o enzimática. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActR11a al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o de todos los azúcares, excepto el azúcar de la unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que deja la secuencia de aminoácidos intacta. La escisión

enzimática de restos de carbohidrato en los polipéptidos ActR11a se puede lograr mediante el uso de una variedad de endoglicosidasas y exoglicosidasas, tal y como se describe en Thotakura *et al.* (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActR11a se puede ajustar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y vegetales pueden introducir todas ellas diferentes patrones de glicosilación que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActR11a para uso en seres humanos se pueden expresar en una línea celular de mamífero que proporcione una glicosilación adecuada, tal como las líneas celulares CHO o HEK293, aunque se espera que otras líneas de células de expresión en mamíferos también sean útiles.

En esta memoria se describen métodos para generar mutantes, en particular grupos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActR11a, así como mutantes de truncamiento; las agrupaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito de analizar tales genotecas combinatorias puede ser para generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActR11a que se unan a la activina o a otros ligandos. Una variedad de ensayos de detección se proporciona a continuación, y tales ensayos se pueden usar para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActR11a se puede analizar para detectar la capacidad para unirse a un ligando de ActR11a, para evitar la unión de un ligando de ActR11a a un polipéptido ActR11a o para interferir en la señalización ocasionada por un ligando de ActR11a.

La actividad de un polipéptido ActR11a o de sus variantes también se puede evaluar en un ensayo *in vivo* o basado en células. Por ejemplo, se puede determinar el efecto de una variante de polipéptido ActR11a sobre la proliferación o la supervivencia de células cancerosas. Las células cancerosas pueden hacer referencia a células en un sujeto vivo que forman un tumor sólido o a células que se han originado a partir de un tumor y que se han extendido a otros sitios dentro de un sujeto vivo (es decir, células metastásicas). Además, las células cancerosas pueden referirse a células obtenidas o derivadas a partir de un tumor o una neoplasia y que se cultivan *in vitro*. Las células cancerosas también incluyen líneas celulares que se pueden cultivar *in vitro* o emplear en estudios de xenoinjertos en un animal, por ejemplo. Las células cancerosas también se refieren a células obtenidas a partir de células metastásicas a través de la división celular después de la metástasis. Las células pueden ser sensibles a hormonas (por ejemplo, positivas para el receptor de estrógenos) o independientes de hormonas (por ejemplo, negativas al receptor de estrógenos). La proliferación o la supervivencia de las células cancerosas se puede evaluar en presencia de una o varias proteínas de ligandos de ActR11a recombinantes (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar con el fin de producir un polipéptido ActR11a y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActR11a. Del mismo modo, un polipéptido ActR11a se puede administrar a un ratón o a otro animal, y se puede determinar una o varias mediciones, tales como el tamaño del tumor, o la tasa de proliferación celular o la apoptosis respecto a un testigo.

Las variantes obtenidas de forma combinatoria se pueden generar de forma que tengan una potencia selectiva o generalmente incrementada en relación con un polipéptido ActR11a de origen natural. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan semividas intracelulares muy diferentes de las del polipéptido ActR11a de tipo natural correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver ya sea más estable o menos estable a la degradación proteolítica o a otros procesos celulares que producen la destrucción o, de otra manera, la desactivación de un polipéptido ActR11a nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido ActR11a, modulando la semivida de los polipéptidos ActR11a. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActR11a recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión con Fc, las mutaciones se pueden realizar en el enlazador (si existe) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Una genoteca combinatoria se puede producir por medio de una genoteca degenerada de genes que codifican una genoteca de polipéptidos en donde cada uno incluye al menos una porción de secuencias potenciales de polipéptidos ActR11a. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente a secuencias génicas, de tal manera que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos de polipéptido ActR11a sea expresable como polipéptidos individuales, o de forma alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para la presentación en fagos).

Hay muchas maneras de generar la genoteca de homólogos potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede llevarse a cabo en un sintetizador automático de ADN, y los genes sintéticos se pueden ligar a continuación en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura *et al.*, (1981) "Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules", compilador AG Walton, Amsterdam: Elsevier págs. 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). Tales técnicas se han empleado 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 los documentos de patentes de EE. UU. N.ºs 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Como alternativa, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una genoteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar y aislar variantes del polipéptido ActR11a a partir de una genoteca mediante análisis,

usando, por ejemplo, mutagénesis de barrido 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), mediante mutagénesis de barrido de enlazador (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); mediante mutagénesis de saturación (Meyers *et al.*, (1986) *Science* 232:613); mediante mutagénesis por PCR (Leung *et al.*, (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, incluida la 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* 7:32-347). La mutagénesis de barrido de enlazador, particularmente en un marco combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIa.

En la técnica se conoce una amplia gama de métodos para analizar productos génicos de genotecas combinatorias producidas por mutaciones puntuales y truncamientos, y, para el caso, para analizar genotecas de ADNc en busca de productos génicos que tienen una propiedad particular. Tales técnicas serán generalmente adaptables para un análisis rápido de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIa. Las técnicas utilizadas más ampliamente para el análisis de genotecas grandes comprenden típicamente clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la genoteca de vectores resultante, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite un aislamiento relativamente sencillo del vector que codifica el gen cuyo producto se había detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.

Los polipéptidos ActRIIa pueden comprender adicionalmente modificaciones posteriores a la traducción además de cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos ActRIIa. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIa modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, polisacáridos o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIa se pueden someter a ensayo, tal y como se describe en este documento para otras variantes de polipéptidos ActRIIa. Cuando un polipéptido ActRIIa se produce en células mediante la escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIa, el procesamiento posterior a la traducción también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades posteriores a la traducción y se pueden escoger de modo que se asegure la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRIIa.

Los polipéptidos ActRIIa útiles en la invención son proteínas de fusión ActRIIa-Fc, tal y como se especifica en una reivindicación, que tienen uno o varios dominios de fusión que incluyen una región constante de la cadena pesada de inmoglobulina (Fc). Un dominio de fusión se puede seleccionar de modo que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el fin de una purificación por afinidad, se emplean matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas de glutatión, amilasa y resinas conjugadas de níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress<sup>®</sup> (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, un dominio de fusión se puede seleccionar con el fin de facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIa. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen distintas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como "epítomos marcadores", que son por lo general secuencias peptídicas cortas para las que hay disponible un anticuerpo específico. Los epítomos marcadores bien conocidos, para los que hay disponibles anticuerpos monoclonales específicos, incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y marcadores c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión para proteasas, tal como para el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo se liberen las proteínas recombinantes de los mismos. Las proteínas liberadas se pueden aislar a continuación, a partir del dominio de fusión, mediante una separación cromatográfica posterior. Un polipéptido ActRIIa se puede fusionar con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIa *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida en suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, a una reducción del aclaramiento en el riñón o a otro efecto farmacocinético. Existe constancia de que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Del mismo modo, las fusiones con seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen los dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y los dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional).

Como ejemplo específico, una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIa fusionado con un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 6) se puede utilizar para tratar o prevenir un cáncer de mama.

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~T~~LMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP~~I~~EKTISKAK  
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~TPPVLDSDG  
 PFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK\*

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o varias mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o varias de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asp-265) ha reducido su capacidad de unión con el receptor Fc $\gamma$ , con respecto a un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o varias de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) ha aumentado su capacidad para unirse al receptor Fc relacionado con el MHC de clase I (FcRN), con respecto a un dominio Fc de tipo natural. En general se entiende que un dominio Fc puede incluir porciones más pequeñas o más grandes de la región constante de una inmunoglobulina, a condición de que el "dominio Fc" resultante conserve la capacidad de dimerización de forma covalente a través de un enlace disulfuro y forme una proteína soluble relativamente estable.

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden estar dispuestos de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa puede estar situado en posición C-terminal respecto a un dominio heterólogo o, como alternativa, un dominio heterólogo puede estar situado en posición C-terminal respecto a un polipéptido ActRIIa. El dominio del polipéptido ActRIIa y el dominio heterólogo no tienen que estar adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios adicionales o secuencias de aminoácidos en posición C-terminal o N-terminal respecto a cualquier dominio o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa útiles en la invención pueden contener una o varias modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, tales modificaciones aumentan la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRIIa, mejoran la semivida circulante de los polipéptidos ActRIIa o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIa. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIa y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluyen, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIa) y modificaciones de un resto de carbohidrato (que incluyen, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidrato a partir de un polipéptido ActRIIa). Tal y como se usa en este documento, la expresión "dominio estabilizador" no solo 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, tales como un resto de carbohidrato, o un resto no proteico, tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, la invención emplea formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIa, que se aíslan a partir de otras proteínas, o de otro modo sustancialmente exentas de otras proteínas. Los polipéptidos ActRIIa se producirán generalmente por la expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

### 3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIa

En esta memoria se describen ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIa (por ejemplo, los polipéptidos ActRIIa solubles), que incluyen fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en este documento. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIa humano presente en la naturaleza, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o de ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ActRIIa o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en una estrategia de terapia génica).

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIa incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 4 o 5. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

Un método para tratar o prevenir el cáncer de mama puede emplear secuencias aisladas o recombinantes de ácidos nucleicos que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID NO: 4 o 5. Un experto en la técnica apreciará que se pueden emplear secuencias de ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO: 4 o 5, y variantes de SEQ ID NO: 4 o 5. Las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento pueden estar aisladas, ser recombinantes y/o estar fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una genoteca de ADN.

En esta memoria se describen ácidos nucleicos que incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas con la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 4 o 5, la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 4 o 5, o fragmentos de las mismas. Un experto en la técnica entenderá fácilmente que las condiciones rigurosas apropiadas que favorecen la hibridación de ADN se pueden modificar. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación con 6,0 x cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida de un lavado con 2,0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado se puede seleccionar desde un rigor bajo de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C hasta un rigor elevado de aproximadamente 0,2 x SSC a

50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede incrementarse desde condiciones poco rigurosas a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones muy rigurosas a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como las sales se pueden variar, o la temperatura o la concentración salina puede mantenerse constante mientras que se cambia la otra variable. En una realización, en los métodos descritos en este documento, se utilizan ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones poco rigurosas de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos descritos en SEQ ID NOs: 4 o 5 debido a la degeneración del código genético también se contemplan en este documento. Por ejemplo, una serie de aminoácidos están designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto entre las células de mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o varios nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural.

Los ácidos nucleicos recombinantes descritos en este documento pueden estar ligados funcionalmente a una o varias secuencias de nucleótidos reguladoras en una estructura artificial de expresión.

Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula hospedadora usada para la expresión. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y de secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células hospedadoras. Típicamente, la o las secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles, tal y como se conocen en la técnica, se contemplan en la invención.

Los promotores pueden ser promotores de origen natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una estructura artificial de expresión puede estar presente en una célula o en un episoma, tal como un plásmido, o la estructura artificial de expresión se puede insertar en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.

En esta memoria se describe un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActR11a que está ligado funcionalmente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son tipos conocidos en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActR11a. En consecuencia, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Los ejemplos de secuencias reguladoras se describen en Goeddel; "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera entre una amplia variedad de secuencias controladoras de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando están ligadas funcionalmente a ella, se puede utilizar en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActR11a. Tales secuencias útiles de control de la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa de T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones controladoras de la proteína de la cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento  $\alpha$  de la levadura, el promotor poliedron del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de las mismas. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar y/o del tipo de proteína que se desea expresar. Por otra parte, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante descrito en este documento se puede producir ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero) o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActR11a recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos obtenidos a partir de pBR322, plásmidos obtenidos a partir de pEMBL, plásmidos obtenidos a partir de pEX, plásmidos obtenidos a partir de pBTac y plásmidos obtenidos a partir de pUC, para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, y una o varias unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores obtenidos a partir de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos, adecuados para la

transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias procedentes de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Como alternativa, los derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, obtenido a partir de pREP y p205) se pueden utilizar para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Algunos ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluidos los retrovirus) se pueden encontrar más adelante en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para consultar otros sistemas de expresión adecuados, tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes en general, véase "Molecular Cloning A Laboratory Manual", 3ª ed., compilado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores obtenidos a partir de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores obtenidos a partir de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores obtenidos a partir de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene  $\beta$ -gal).

Se puede diseñar un vector para producir los polipéptidos ActRIIa objeto en células CHO, tal como un vector pCMV-Script (Stratagene, La Jolla, CA), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, las estructuras artificiales génicas objeto pueden usarse para producir la expresión de los polipéptidos ActRIIa objeto en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

Esta descripción también se refiere a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificadora (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 o 5) de uno o varios de los polipéptidos ActRIIa objeto. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa descrito en este documento se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

También se proporcionan en este documento métodos para producir los polipéptidos ActRIIa objeto. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIa se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que tenga lugar la expresión del polipéptido ActRIIa. El polipéptido ActRIIa puede ser secretado y aislado a partir de una mezcla de células y un medio que contiene el polipéptido ActRIIa. Como alternativa, el polipéptido ActRIIa se puede conservar citoplásmicamente o en una fracción de la membrana y las células se recogen, se lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActRIIa objeto pueden aislarse a partir del medio de cultivo celular, de las células hospedadoras o de ambos, usando métodos conocidos en la técnica para purificar proteínas, que incluyen la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, la electroforesis, la purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos de epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIa y la purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido ActRIIa (por ejemplo, se puede utilizar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIa-Fc). El polipéptido ActRIIa puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. La purificación se puede conseguir mediante una serie de etapas cromatográficas en columna, incluidas, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Sefarosa Q, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración vírica e intercambio de tampón. Tal y como se ha mostrado en este documento, la proteína ActRIIa-hFc se purificó hasta tener una pureza >98%, determinada por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según se determinó por SDS-PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr resultados deseables en ratones, ratas y primates no humanos.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder para la purificación, tal como una secuencia de un sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRIIa recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad utilizando una resina de metal  $Ni^{2+}$ . La secuencia líder para la purificación se puede retirar a continuación por tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIa purificado (por ejemplo, véase Hochuli *et al.*, (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht *et al.*, *PNAS USA* 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos terminales romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, rellenado de los extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligación enzimática. Como alternativa, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales que incluyen los sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos se puede realizar usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que, posteriormente, se pueden aparear para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology",

compiladores Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons; 1992).

#### 4. Ensayos de detección

Los polipéptidos ActRIIa (p. ej., polipéptidos ActRIIa solubles) y los polipéptidos de activina se pueden utilizar para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de activina-ActRIIa. Los compuestos identificados a través de esta prueba de detección se pueden examinar para evaluar su capacidad para modular el crecimiento o la supervivencia de las células cancerosas, particularmente de células de cáncer de mama, *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos se pueden someter a ensayo, por ejemplo, en modelos animales tales como modelos de xenoinjertos de ratón. Un modelo animal útil es el modelo de cáncer de mama MDA-MB231 murino; las células MDA-MB231 son independientes de las hormonas y propensas a la metástasis en el hueso. Otros modelos animales de cáncer de mama se pueden generar, por ejemplo, mediante la implantación de células de neuroblastoma de rata (a partir de las cuales se había aislado inicialmente el oncogén neu), o células NIH-3T3 transformadas con neu en ratones sin pelaje, esencialmente tal y como describen Drebin *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9129-9133 (1986).

Existen numerosos métodos para detectar agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, que tienen como diana la activina y la señalización de ActRIIa. En ciertas realizaciones, se puede realizar una detección de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban los efectos de la activina o mediados por ActRIIa sobre una línea celular seleccionada. En ciertas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo para detectar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. Como alternativa, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. En una realización adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con una activina o un polipéptido ActRIIa.

Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, teniendo en cuenta la presente descripción, aquellos que no se describen expresamente en este documento serán incluidos a pesar de ello por un experto en la técnica. Tal y como se describe en este documento, los compuestos del ensayo (agentes) se pueden crear por cualquier método de química combinatoria. Como alternativa, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas de origen natural, sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se van a evaluar para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, de bajo peso molecular, que incluyen peptidomiméticos) o producidos de forma recombinante. Los compuestos del ensayo contemplados en este documento incluyen moléculas orgánicas que no sean peptidilos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En una realización específica, el agente del ensayo es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular menor de aproximadamente 2.000 Dalton.

Los compuestos del ensayo se pueden proporcionar como entidades discretas, individuales, o se pueden proporcionar en colecciones de mayor complejidad, tales como las preparadas por química combinatoria. Estas colecciones pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos del ensayo al sistema del ensayo puede ser de forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de la detección. Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar optativamente con otros compuestos y tener grupos de derivatización que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S-transferasa (GST), agentes de reticulación fotoactivables o cualquiera de sus combinaciones.

En muchos programas de detección de fármacos que analizan colecciones de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento, a fin de maximizar el número de compuestos estudiados en un periodo de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas exentos de células, tales como los que se pueden obtener con proteínas purificadas o semipurificadas, se prefieren frecuentemente como detecciones "primarias", porque se pueden generar para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular, que está mediada por un compuesto del ensayo. Por otra parte, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto del ensayo se pueden ignorar generalmente en el sistema *in vitro*, centrándose el ensayo en su lugar principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular, que puede manifestarse en una alteración de la afinidad de la unión entre un polipéptido ActRIIa y activina.

Simplemente a modo de ilustración, en un ensayo de detección a modo de ejemplo, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIa aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a la activina. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIa se añade, a continuación, una composición que contiene un ligando de ActRIIa. La detección y la cuantificación de los complejos de ActRIIa/activina proporcionan un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIa y la activina. La eficacia del compuesto se puede determinar generando curvas de respuesta a la dosis a partir de datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto del ensayo. Por otra parte, también se puede realizar un ensayo testigo para proporcionar un valor de referencia para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo testigo, la activina aislada y purificada se añade a una composición que contiene el

polipéptido ActRIIa, y la formación del complejo ActRIIa/activina se cuantifica en ausencia del compuesto del ensayo. Se entenderá, en general, que el orden en el que los reactivos se pueden mezclar por adición puede variar, y se pueden mezclar por adición simultáneamente. Por otra parte, en lugar de proteínas purificadas, se pueden utilizar extractos celulares y lisados para proporcionar un sistema de ensayo adecuado exento de células.

- 5 La formación de un complejo entre el polipéptido ActRIIa y la activina se puede detectar por una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como polipéptido ActRIIa o activina radiomarcados (por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ ), marcados fluorescentemente (por ejemplo, FITC) o marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.
- 10 Los ensayos de polarización de la fluorescencia y de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) se pueden utilizar para medir, ya sea directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIa y su proteína ligada. Otros modos adecuados de detección incluyen, por ejemplo, los basados en guías de onda óptica (documento de publicación PCT WO 96/26432 y Patente de EE. UU. N.º 5.677.196), resonancia de plasmones superficiales (RPS), sensores de carga superficial y sensores de fuerza de superficie.
- 15 Un ensayo de trampa para interacciones, también conocido como el "ensayo de doble híbrido", también se puede utilizar para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE. UU. N.º 5.283.317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; e Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). En una realización específica, un sistema de doble híbrido inverso se puede utilizar para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas de bajo peso molecular o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; y los documentos de patente de EE. UU. N.º 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

- 25 Los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIa o activina, descritos en este documento. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIa o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción se puede identificar a nivel proteico empleando métodos bioquímicos *in vitro*, que incluyen la fotorreticulación, la unión de un ligando radiomarcado y la cromatografía por afinidad (Jakoby WB *et al.*, 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos se pueden analizar en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un activina o polipéptido ActRIIa. Este puede incluir un episodio de unión en fase sólida o en fase fluida. Como alternativa, el gen que codifica una activina o polipéptido ActRIIa se puede transfectar con un sistema informador (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y analizar frente a la colección, opcionalmente mediante un análisis de alto rendimiento o con miembros individuales de la colección. Se puede utilizar otro mecanismo basado en ensayos de unión, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, perla o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado, o se resuelven por electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar por lo general utilizando resonancia colorimétrica o fluorescente o de plasmones superficiales.

##### 5. Usos terapéuticos ejemplares

- 40 En la presente invención, ciertas proteínas de fusión ActRIIa-Fc se pueden utilizar para tratar o prevenir las metástasis de cáncer de mama o la pérdida ósea relacionada con el cáncer de mama en un individuo que lo requiera. Estos métodos se pueden usar para el tratamiento terapéutico así como profiláctico de seres humanos, en particular mujeres, que tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama. Como todas las mujeres tienen riesgo de desarrollar cáncer de mama, una mujer con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama es una mujer cuyos factores de riesgo confieren una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad, en comparación con la población general o con la población de mujeres dentro de un determinado grupo de edad. Los ejemplos de factores de riesgo incluyen la edad, los antecedentes familiares o la dotación genética, los hábitos de estilo de vida, como el ejercicio y la dieta, la exposición a radiación o a otros agentes causantes de cáncer, la edad en el momento del nacimiento del primer hijo, los cambios genéticos y el aumento de peso después de la menopausia.

- 50 Tal y como se usa en este documento, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o una afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o la afección en la muestra tratada, con respecto a una muestra testigo sin tratar, o retrasa la aparición de uno o varios síntomas o características del trastorno o la afección, en relación con la muestra testigo sin tratar. Por ejemplo, la prevención del cáncer de mama se puede referir a la ausencia de nuevas lesiones después del tratamiento, o a la ausencia o el retraso de una enfermedad metastásica.

- 55 La expresión "tratamiento del cáncer de mama" se refiere a una mejora de uno o varios síntomas o características de la enfermedad, en relación con un testigo sin tratar o en relación con la gravedad de la enfermedad antes del tratamiento. La expresión no implica necesariamente que el paciente que recibe el tratamiento se cure o que la enfermedad sea completamente erradicada del paciente. Un agente que trata el cáncer de mama puede ser un agente que reduce la gravedad de uno o varios síntomas o características de la enfermedad. Cabe señalar que el

crecimiento y la progresión del tumor están influenciados por una variedad de factores, que incluyen los mediadores de la progresión del ciclo celular y la división celular y los reguladores de la muerte celular o apoptosis. En consecuencia, el tratamiento del cáncer de mama puede implicar una disminución de la proliferación de las células cancerosas o una disminución de la tasa de división celular. Como alternativa o adicionalmente, el tratamiento del cáncer de mama puede implicar una disminución de la supervivencia de las células cancerosas, un aumento de la apoptosis o una disminución de la incidencia o gravedad del cáncer de mama metastásico, en particular el cáncer de mama metastásico del hueso. En consecuencia, el tratamiento del cáncer de mama puede implicar tanto una disminución de la división celular como un aumento de la muerte celular. Independientemente del mecanismo, la eficacia de un agente en el tratamiento del cáncer de mama se puede determinar por mediciones observables, tales como un menor número de células cancerosas en comparación con un testigo (ya sea debido a la disminución de la proliferación, al aumento de la apoptosis, o a ambos), o una disminución en el tamaño del tumor, en comparación con un testigo. Por lo tanto, el tratamiento del cáncer de mama o la inhibición de los tumores o el crecimiento celular del cáncer debe ser neutral en cuanto al mecanismo por el cual se produce un cambio de ese tipo. Tanto la prevención como el tratamiento se pueden apreciar en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro profesional sanitario, y el análisis del resultado previsto con la administración del agente terapéutico.

Al observar los efectos de los antagonistas objeto sobre la progresión del cáncer de mama en humanos, se puede evaluar un efecto a través de una disminución o desaparición de una enfermedad medible, y/o la ausencia de nuevas lesiones o la prevención de metástasis. Por ejemplo, los antagonistas de activina-ActRIIa pueden reducir o retrasar significativamente la progresión del cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama invasivo y no invasivo. Además, los antagonistas pueden prevenir o reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres sanas con factores de riesgo de la enfermedad. Los antagonistas también pueden reducir el riesgo de recurrencia del cáncer de mama en pacientes con un historial de la enfermedad.

En consecuencia, los antagonistas de activina-ActRIIa se pueden utilizar para prevenir o retrasar la aparición del cáncer de mama en individuos que se considera que tienen un riesgo de desarrollar la enfermedad, y tales antagonistas se pueden utilizar en poblaciones de pacientes seleccionados. Los ejemplos de poblaciones adecuadas de pacientes incluyen pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama y de ovario, tales como pacientes de sexo femenino con una madre o hermana a la que se ha diagnosticado la enfermedad. Los pacientes que tienen mutaciones en los genes BRCA1/2 o en otros genes que muestran una predisposición en las mujeres hacia el cáncer de mama y de ovario, también se incluyen. En una realización, un paciente que se considera que tiene un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama, pero al que se no ha diagnosticado la enfermedad, se trata con un antagonista de activina-ActRIIa. Este tratamiento puede comenzar cuando el paciente llega a la edad de 30, 35 o 40 años, o cuando un paciente femenino no está tratando de concebir (es decir, el paciente no tiene intención de amamantar a un bebé) o ha llegado a la menopausia. En particular, los datos presentados en este documento muestran que los antagonistas de activina-ActRIIa inhiben la diseminación metastásica de una línea celular de cáncer de mama introducida en la circulación general, lo que muestra que tales antagonistas pueden ser útiles en la prevención de las metástasis de tumores de mama. Tales compuestos serían útiles en el tratamiento de cualquier paciente al que se haya diagnosticado un cáncer de mama o que se sospeche que tiene cáncer de mama. Además, los pacientes que estén considerando realizar una mastectomía preventiva o electiva, debido a un riesgo elevado de desarrollar un tumor de mama, pueden elegir en su lugar, o además, tomar un antagonista de activina ActRIIa para disminuir el riesgo de diseminación metastásica de los tumores no detectados.

Los antagonistas de activina-ActRIIa descritos en este documento, y en particular proteínas ActRIIa-Fc, se pueden usar para tratar o prevenir el cáncer de mama en un paciente, incluidos pacientes con tumores sólidos, así como pacientes con cáncer metastásico. Los antagonistas de activina-ActRIIa también se pueden administrar a sujetos humanos con lesiones precancerosas o benignas de mama o con cualquier tipo de lesión proliferativa anómala, incluidas hiperplasia típica, hiperplasia atípica y carcinoma no invasivo o *in situ*. Los antagonistas de la presente descripción también son útiles en el tratamiento o la prevención de cánceres dependientes de hormonas o sensibles a hormonas (por ejemplo, cánceres positivos para receptores de estrógenos) y cánceres independientes de hormonas (por ejemplo, cánceres negativos para receptores de estrógenos o mutantes para los receptores de estrógenos). Los antagonistas de activina-ActRIIa también son útiles como agentes terapéuticos para cánceres en los que están activados factores de crecimiento u oncogenes (por ejemplo, cánceres de mama en los que se expresa la tirosina-cinasa *c-erbB-2* (también conocida como *HER-2/Neu*)). Los antagonistas de activina-ActRIIa podrían resultar particularmente útiles en tumores que expresan niveles elevados (en relación con células obtenidas a partir de tejido de mama normal) de activina (por ejemplo, A, AB o B) o niveles elevados de ActRIIa o ActRIIb.

La presente invención reconoce que la eficacia de las terapias convencionales contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, fototerapia, inmunoterapia y cirugía) se puede mejorar mediante el uso de los antagonistas objeto. En consecuencia, los antagonistas de activina-ActRIIa se pueden utilizar en terapias combinadas para el tratamiento, la prevención o la gestión del cáncer de mama. Los antagonistas se pueden administrar a pacientes en combinación con radiación y/o tratamiento quirúrgico, así como con quimioterapia citotóxica y/o terapias endocrinas. Tales tratamientos combinados pueden funcionar sinérgicamente y permitir la reducción de la dosificación de cada uno de los tratamientos individuales, reduciendo de este modo los efectos secundarios perjudiciales ejercidos por cada tratamiento con dosificaciones más elevadas. En otros casos, los tumores malignos que son refractarios a un tratamiento pueden responder a una terapia combinada de dos o varios tratamientos diferentes. En consecuencia, la descripción se refiere a la administración de un antagonista de activina-

ActRlla en combinación con otro agente antineoplásico convencional, ya sea de forma concomitante o secuencial, con el fin de mejorar el efecto terapéutico del agente antineoplásico o superar la resistencia celular a tales agentes antineoplásicos.

5 Los compuestos farmacéuticos que se pueden utilizar en la terapia antitumoral combinada incluyen, simplemente a modo de ilustración: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, bcg, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, campotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dienestrol, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelina, hidroxiaurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecán, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazol, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, suramina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecán, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

Estos compuestos antitumorales quimioterapéuticos se pueden clasificar por su mecanismo de acción, por ejemplo, en los siguientes grupos: agentes antimetabolitos/anticáncer, tales como análogos de pirimidina (5-fluorouracilo, floxuridina, capecitabina, gemcitabina y citarabina) y análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/antimitóticos que incluyen productos naturales tales como alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina), desorganizadores de microtúbulos tales como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, epitolonas y navelbina, epidipodoflotoxinas (etopósido, tenipósido), agentes que dañan el ADN (actinomicina, amsacrina, antraciclinas, bleomicina, busulfán, camptotecina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citoxán, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelaminaoxaliplatino, ifosfamida, melfalán, mercloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, plicamicina, procarbazona, taxol, taxotere, tenipósido, trietilentiofosforamida y etopósido (VP16)); antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente la L-asparagina y hace que las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina carezcan de ella); agentes antiplaquetarios; agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como las mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), sulfonatos de alquilo-busulfán, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos - dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como los análogos de ácido fólico (metotrexato); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiaurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de aromatas (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales sintéticas de heparina y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (tales como el activador del plasminógeno tisular, estreptocinasa y urocinasa), aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigratorios; agentes antiseoretos (breveldina); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, micofenolato mofetilo); compuestos antiangiogénicos (TNP-470, genisteína) e inhibidores de factores de crecimiento (inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)); bloqueador del receptor de angiotensina, donantes de óxido nítrico; oligonucleótidos no codificantes; anticuerpos (trastuzumab); inhibidores del ciclo celular e inductores de la diferenciación (tretinoína); inhibidores de mTOR, inhibidores de la topoisomerasa (doxorubicina (adriamicina), amsacrina, camptotecina, daunorrubicina, dactinomicina, eniposida, epirubicina, etopósido, idarrubicina y mitoxantrona, topotecán, irinotecán), corticosteroides (cortisona, dexametasona, metilprednisolona, prednisona y prednisolona); inhibidores de la cinasa de la transducción de la señal del factor de crecimiento; inductores de la disfunción mitocondrial y activadores de caspasas; desorganizadores de cromatina.

Los compuestos farmacéuticos que se pueden utilizar para la terapia combinada incluyen agentes antiangiogénesis, tales como (1) inhibidores de la liberación de "moléculas angiogénicas", tales como bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico); (2) neutralizadores de moléculas angiogénicas, tales como anticuerpos anti-βbFGF; y (3) inhibidores de la respuesta de células endoteliales a estímulos angiogénicos, incluido el inhibidor de la colagenasa, inhibidores de la renovación de la membrana basal, esteroides angiostáticos, inhibidores de la angiogénesis derivados de hongos, factor plaquetario 4, trombospondina, fármacos para la artritis tales como D-penicilamina y tiomalato de oro, análogos de la vitamina D3, alfa-interferón y similares. Para consultar inhibidores de la angiogénesis propuestos adicionalmente, véase Blood *et al.*, Bioch. Biophys. Acta, 1032:89-118 (1990), Moses *et al.*, Science, 248:1408-1410 (1990), Ingber *et al.*, Lab. Invest., 59:44-51 (1988), y los documentos de Patente de EE. UU. N.ºs 5.092.885, 5.112.946, 5.192.744, 5.202.352 y 6.573.256. Además, hay una amplia variedad de compuestos que se pueden utilizar para inhibir la angiogénesis, por ejemplo, péptidos o agentes que bloquean la ruta de la angiogénesis mediada por VEGF, la proteína endostatina o derivados, fragmentos de angiostatina que se unen a lisina, melanina o compuestos que favorecen la melanina, fragmentos de plasminógeno (por ejemplo, kringles 1-3 del plasminógeno), subunidades de tropoina, antagonistas de vitronectina αvβ3, péptidos obtenidos a partir de Saposina B, antibióticos o análogos (por ejemplo, tetraciclina o neomicina), composiciones que contienen dienogest,

compuestos que comprenden un núcleo MetAP-2 inhibitor, acoplado a un péptido, el compuesto EM-138, chalcona y sus análogos, y los inhibidores de NAALADasa. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE. UU. N.<sup>os</sup> 6.395.718, 6.462.075, 6.465.431, 6.475.784, 6.482.802, 6.482.810, 6.500.431, 6.500.924, 6.518.298, 6.521.439, 6.525.019, 6.538.103, 6.544.758, 6.544.947, 6.548.477, 6.559.126 y 6.569.845.

5 Dependiendo de la naturaleza de la terapia combinada, la administración de los antagonistas terapéuticos de la invención puede continuar mientras que la otra terapia se está administrando y/o a partir de entonces. La administración de los antagonistas descritos en este documento puede realizarse en una dosis única o en dosis múltiples. En algunos casos, la administración de los antagonistas se inicia al menos varios días antes de la terapia convencional, mientras que en otros casos, la administración se inicia inmediatamente antes o en el momento de la administración de la terapia convencional.

#### 6. Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas de activina-ActRIIa descritos en este documento se pueden formular 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 antagonistas objeto se pueden formular para administrar de cualquier manera conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

Los antagonistas se pueden administrar sistémicamente o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención, por supuesto, está en una forma exenta de pirógenos, fisiológicamente aceptable. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de activina-ActRIIa que también se pueden incluir opcionalmente en la composición, tal y como se ha descrito anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los antagonistas objeto en los métodos de la invención.

Por lo general, los antagonistas de activina-ActRIIa serán administrados parenteralmente. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o varios polipéptidos ActRIIa combinados con una o varias soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, farmacéuticamente aceptables, estériles e isotónicas, o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Una fluidez apropiada puede conservarse, por ejemplo, empleando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el 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 de administración a un sitio de tejido diana (por ejemplo, el epitelio mamario). En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, el epitelio mamario), de esto modo se proporciona una estructura para el tejido en desarrollo y que se puede reabsorber de forma óptima en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIa. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y definidos químicamente. Otros materiales potenciales son biodegradables y están bien definidos biológicamente, tales como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices están compuestas por proteínas puras o por componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables y están definidas químicamente, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar formadas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como poli(ácido láctico) e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos se pueden alterar en su composición, tal como en aluminato-fosfato de calcio y estar procesados para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

Los antagonistas descritos en este documento pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sobres, píldoras, comprimidos, obleas (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o de agua-en-aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como lavados bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un antagonista también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En formas de dosificación sólidas para una administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos,

gránulos y similares), uno o varios antagonistas terapéuticos se pueden mezclar con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes de desintegración, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras, usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado y similares.

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

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

Las composiciones útiles en la invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de dosificación adecuado para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama será determinado por el médico encargado, considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto, útiles en la invención. Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, la edad del paciente, el sexo y la dieta, la gravedad de la enfermedad, el tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final puede afectar también a la dosificación. El progreso puede monitorizarse mediante una evaluación periódica de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, el tamaño del tumor, el estadio o el grado histológico, el estado de los receptores de estrógeno o progesterona, la angiogénesis y la metástasis en ganglios linfáticos regionales. El médico también puede monitorizar marcadores tales como los niveles de la proteína uPA/PAI1 - niveles elevados de uPA y PAI1 están asociados con un alto riesgo de metástasis - y una amplificación del gen Her-2 y/o una expresión de la proteína también se asocian con metástasis (Weigelt *et al.* 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602). Realizar el perfil de la expresión génica también puede ser útil en la monitorización de la progresión de una enfermedad (van 't Veer *et al.* 2002 Nature 415: 530-536 y van de Vijver *et al.* 2002 N. Engl. J. Med. 347: 1999-2009).

El cáncer de mama se puede tratar o prevenir empleando métodos que implican la terapia génica 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 implicados en el cáncer de mama, tales como, por ejemplo, las células epiteliales mamarias. La administración de secuencias de polinucleótidos ActRIIa se puede lograr utilizando un vector de expresión recombinante, tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos ActRIIa, el uso de liposomas dirigidos.

Varios vectores víricos que se pueden utilizar para la terapia génica, tal y como se describe en este documento, incluyen adenovirus, virus del herpes, virus vaccinia o un virus de ARN tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un gen extraño aislado incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Una variedad de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable, de modo que las células transducidas se pueden identificar y generar. Los vectores retrovirales se pueden preparar de forma que sean

específicos de una diana, por ejemplo, fijando un azúcar, un glicolípido o una proteína. El reconocimiento de una diana preferida se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retrovívico, o fijar a una envuelta vírica para permitir la entrega específica en la diana del vector retrovívico que contiene el polinucleótido ActR11a.

- 5 Como alternativa, las células de cultivos tisulares se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovívicos gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. Estas células se transfectan a continuación con el vector plasmídico que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovívico en el medio de cultivo.

- 10 Otro sistema de administración dirigido a una diana para los polinucleótidos ActR11a es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas membranales artificiales que son útiles como vehículos de entrega *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos se pueden encapsular dentro del interior acuoso y administrarse a células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para una transferencia  
15 génica eficaz utilizando un vehículo de liposoma son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es generalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de  
20 cationes divalentes.

- Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. Dirigir hacia una diana los liposomas también es posible basándose, por ejemplo, en la especificidad del órgano, la  
25 especificidad celular y la especificidad del orgánulo, y es conocido en la técnica.

#### Ejemplificación

La invención descrita hasta ahora en general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

- 30 Ejemplo 1: Proteínas de fusión ActR11a-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActR11a que tiene el dominio extracelular de ActR11a humano fusionado con un dominio Fc humano o de ratón, con un enlazador mínimo entre ambos. Las estructuras artificiales se conocen como ActR11a-hFc y ActR11a-mFc, respectivamente.

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

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG**  
**CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK**  
**PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF**  
**NWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALP**  
**VPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP**  
**ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSL**

- 35 **SPGK**

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

- (i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVIVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8),  
 (ii) Activador del plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9), y  
 40 (iii) Nativa: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

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



tenía una semivida en suero de 11-14 días y los niveles circulantes del fármaco eran bastante altos después de dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente). En monos cangrejeros, la semivida en plasma fue sustancialmente mayor de 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.

#### Ejemplo 2: Caracterización de una proteína ActRIIa-hFc

La proteína de fusión ActRIIa-hFc se expresó en células CHO-DUKX B11 transfectadas de forma estable desde un vector pAID4 (ori/potenciador de SV40, promotor CMV), empleando una secuencia líder de plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 9. La proteína, purificada tal y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, tenía una secuencia de SEQ ID NO: 7. La porción Fc es una secuencia Fc de IgG1 humana, tal como se muestra en SEQ ID NO: 7. El análisis con ácido siálico mostró que la proteína contenía, en promedio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIa-hFc.

Esta proteína purificada mostraba una semivida en suero notablemente larga en todos los animales sometidos a ensayo, incluida una semivida de 25-32 días en pacientes humanos (véase el Ejemplo 3, a continuación). El material expresado en células CHO tiene una mayor afinidad por el ligando de la activina B que la descrita para una proteína de fusión ActRIIa-hFc expresada en células 293 humanas (del Re *et al.*, J. Biol. Chem. 2004, 17 de diciembre; 279(51): 53126-35). Además, el uso de la secuencia líder tPa proporcionó una mayor producción que otras secuencias líderes y, a diferencia de ActRIIa-Fc expresada con un líder natural, proporcionó una secuencia N-terminal altamente pura. El uso de la secuencia líder natural dio lugar a dos especies principales de ActRIIa-Fc, teniendo cada una de ellas una secuencia N-terminal diferente.

#### Ejemplo 3: Ensayo clínico en humanos (no está dentro del alcance de la invención)

La proteína descrita en el Ejemplo 2 se administró a pacientes humanos en un estudio aleatorizado, doble ocultación, controlado con placebo, que se llevó a cabo para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres posmenopáusicas sanas. Cuarenta y ocho sujetos fueron asignados al azar en cohortes de 6 para recibir ya sea una dosis única de ActRIIa-hFc o placebo (5 activas:1 placebo). Los niveles de dosis variaron de 0,01 a 3,0 mg/kg por vía intravenosa (IV) y de 0,03 a 0,1 mg/kg por vía subcutánea (SC). Se realizó un seguimiento de todos los sujetos durante 120 días. Los sujetos fueron excluidos de la participación en el estudio si tomaban medicamentos que afectaban el metabolismo óseo hasta 6 meses después del inicio del estudio. Las evaluaciones de seguridad se llevaron a cabo haciendo un seguimiento de cada cohorte para determinar el aumento de la dosis. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), la actividad biológica de ActRIIa-hFc también se evaluó midiendo los marcadores bioquímicos de la formación y resorción ósea, y los niveles de FSH.

No se describieron eventos adversos graves en este estudio. Los eventos adversos (EAs) fueron generalmente leves y transitorios. El análisis preliminar de los EAs incluía dolor de cabeza, valores de laboratorio elevados, síntomas de resfriado, emesis o vómitos, infiltración intravenosa y hematoma en el lugar de la inyección.

Los análisis PK de ActRIIa-hFc mostraban un perfil lineal con la dosis, y una semivida media de aproximadamente 25-32 días. El área bajo la curva (AUC) para ActRIIa-hFc estaba relacionada linealmente con la dosis, y la absorción después de la dosificación SC era esencialmente completa. Estos datos indican que la vía SC es una estrategia deseable para la dosificación, ya que proporciona una biodisponibilidad y una semivida en suero del fármaco equivalentes, a la vez que evita el aumento en las concentraciones séricas de fármaco, asociado con los primeros días de la dosificación IV. ActRIIa-hFc provocó un aumento rápido y sostenido dependiente de la dosis en los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica del hueso (BAP), que es un marcador para el crecimiento óseo anabólico, y una disminución dependiente de la dosis en los niveles de telopéptido C-terminal de colágeno de tipo 1 y de fosfatasa ácida 5b resistente al tartrato, que son marcadores de la resorción ósea. Otros marcadores, tales como P1NP mostraron resultados no concluyentes. Los niveles de BAP mostraron efectos cercanos a la saturación con la dosificación más alta del fármaco, lo que indica que los efectos semimáximos en este biomarcador anabólico óseo podrían lograrse con una dosificación de 0,3 mg/kg, con incrementos que llegan hasta 3 mg/kg. Calculada como una relación del efecto farmacodinámico frente a AUC para el fármaco, la CE50 es 51.465 (día\*ng/ml). Estos cambios en los biomarcadores óseos se mantuvieron durante aproximadamente 120 días con los niveles de dosis más elevados sometidos a ensayo. También hubo una disminución dependiente de la dosis en los niveles de FSH séricos, compatible con la inhibición de la activina.

Una sola dosis de ActRIIa-hFc administrada a mujeres posmenopáusicas sanas resultó ser segura y bien tolerada en el intervalo de niveles de dosis sometido a ensayo. Los efectos PK y farmacodinámicos prolongados sugieren que una dosificación intermitente sería apropiada para estudios futuros. Por ejemplo, una dosificación en función de la semivida en suero se podría realizar una vez al mes, o aproximadamente una vez cada dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas. Además, debido a que el efecto farmacodinámico se extiende mucho más allá de la permanencia en el suero del fármaco, la dosificación se podría realizar basándose en el efecto farmacodinámico, lo que significa que la dosificación cada tres meses o cada dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso doce meses, puede ser eficaz para producir el efecto deseado en los pacientes. Este ensayo clínico muestra que, en los seres humanos, ActRIIa-hFc es un agente osteoanabólico con evidencia biológica de un incremento de la formación ósea y una disminución de la

resorción ósea.

Ejemplo 4: ActR11a-Fc reduce o evita la pérdida ósea debida a metástasis del cáncer de mama

Se estima que de 65 a 75 por ciento de los cánceres de mama sufren metástasis en el hueso, lo cual provoca un daño sustancial a la estructura ósea, que incrementa el riesgo de fractura y causa dolor y otros efectos secundarios. Hemos sometido a ensayo los efectos de ActR11a-Fc en un modelo de ratón de cáncer de mama que tiene metástasis en los huesos.

Una sublínea de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (clon 2287, Kang *et al.* Cancer Cell 2003, vol. 3:537-549) se cultivó *in vitro* y las células se recogieron con una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml. MDA-MB-231 es una línea celular que es altamente competente para la siembra en el hueso y causa un daño óseo similar al causado por las metástasis óseas. Se inyectaron 10  $\mu$ l de células en la tibia de ratones hembra sin pelaje y sin timo de 6 semanas de edad, el día 0 del estudio. El día 10 del estudio, los ratones recibieron ActR11a-mFc (10 mg/kg/dos veces por semana/subcutáneo) (n = 8) o vehículo de PBS (n = 7). La progresión de la enfermedad se determinó por los cambios en la densidad mineral ósea utilizando absorciometría de rayos X de energía dual (PIXIMus) a intervalos semanales. Los ratones fueron tratados con ActR11a-mFc durante 4 semanas y luego sacrificados y se recogieron las tibias (tanto con tumor inyectado como sin tumor) de cada animal. Las tibias se procesaron a continuación y se prepararon para una tomografía microcomputerizada (microCT) y análisis histológico.

Una inyección intratibial de células MDA-MB-231 en ratones sin pelaje atómicos favoreció el desarrollo de lesiones óseas osteolíticas en la tibia inyectada, en comparación con la pata contralateral. El análisis con microTC de la tibia proximal mostró una reducción del 62% en el volumen del hueso esponjoso en las tibias portadoras de MDA-MB-231, en comparación con las tibias sin tumor en ratones tratados con vehículo de PBS. El tratamiento con ActR11a-mFc condujo a un incremento del 70% o 147% en las tibias sin tumor o en las portadoras de tumor, respectivamente, en comparación con el vehículo (P <0,01 para ambas). Las tibias portadoras de tumor de ratones tratados con ActR11a-mFc tenían una densidad similar de hueso esponjoso a las tibias sin tumor de los ratones tratados con VEH ( $p = 0,39$ ).

Por lo tanto, ActR11a-mFc es capaz de eliminar la lesión ósea asociada con la presencia de células de tumor de mama en el hueso.

Ejemplo 5: ActR11a-Fc reduce las metástasis de cáncer de mama y favorece la supervivencia

Como un modelo de enfermedad metastásica, las células MDA-MB-231 se pueden introducir en ratones mediante inyección intracardiaca. Las células inyectadas en el ventrículo izquierdo migrarán a través del torrente sanguíneo y formarán lesiones metastásicas en sitios distales. Una línea celular derivada MDA-MB-231-luc-D3H2LN (Caliper Life Sciences) es una línea celular que expresa luciferasa, lo que permite la monitorización no invasiva de la formación de tumores metastásicos, usando tecnología tomográfica biofotónica (Caliper Life Sciences). Este modelo se utilizó para evaluar el potencial de ActR11a-mFc para disminuir la formación de lesiones metastásicas del cáncer de mama.

Las células MDA-MB-231-luc-D3H2LN se introdujeron mediante inyección intracardiaca en veintiséis ratones sin pelaje atómicos. Catorce ratones fueron tratados con vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) y doce fueron tratados con ActR11a-mFc (10 mg/kg, dos veces a la semana, inyección subcutánea) comenzando dos semanas antes de la administración del tumor y continuando durante el curso del estudio. Otros nueve ratones fueron inyectados de forma simulada con células y fueron tratados con ActR11a-mFc. Los ratones fueron anestesiados periódicamente y se visualizó la emisión bioluminiscente para detectar la formación de una progresión metastásica.

El grupo de tratamiento con ActR11a-mFc mostró un desarrollo sustancialmente reducido de las lesiones metastásicas. En la quinta semana, doce de los catorce ratones tratados con vehículo mostraron múltiples señales muy fluorescentes, indicativas de diseminación metastásica, mientras que solo cuatro de los doce ratones tratados con ActR11a-mFc mostraron lesiones similares (Figura 3). Una cuantificación de la intensidad de la fluorescencia mostró una disminución de aproximadamente diez veces en la señal fluorescente de los ratones tratados.

Por otra parte, el tratamiento con ActR11a-mFc aumentó notablemente la supervivencia de los ratones. El día cuarenta del estudio, todos (14/14) los ratones tratados con vehículo habían muerto o habían sido sacrificados (de acuerdo con los procedimientos convencionales para un tratamiento humanitario de animales en estudio), mientras que solo dos (2/12) de los ratones tratados con ActR11a-mFc habían muerto o habían sido sacrificados. El día cuarenta y cinco, 3/12 de los ratones tratados con ActR11a-mFc habían muerto o habían sido sacrificados, y ninguno de los ratones inyectados de forma simulada habían muerto.

Por lo tanto, el tratamiento con ActR11a-mFc provoca una disminución sustancial de la formación de lesiones metastásicas y favorece la supervivencia, en este modelo de cáncer de mama metastásico. Estos datos indican que ActR11a-Fc se puede usar para tratar el cáncer de mama en pacientes humanos, en particular junto con terapias, tales como cirugía, terapia hormonal o quimioterapia tradicional que tienen como objetivo el tumor primario.

Ejemplo 6: Proteínas ActRIIa-Fc alternativas

5 Una diversidad de variantes de ActRIIa que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en este documento se describen en la solicitud de patente internacional publicada como WO2006/012627 (véase, por ejemplo, las págs. 55-60). Una estructura artificial alternativa puede tener una delección de la cola C-terminal (los últimos 15 aminoácidos del dominio extracelular de ActRIIa). La secuencia de esa estructura artificial se presenta a continuación (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG  
 CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP~~EMTGGGTHTCPPCPA~~  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQOGN VFCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

10 Aunque se han descrito realizaciones específicas de la materia, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica, después de la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes. El alcance completo de la invención se debe determinar haciendo referencia a las reivindicaciones y a la memoria descriptiva.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un antagonista de activina-ActRIIa para uso en el tratamiento o la prevención de metástasis del cáncer de mama o la pérdida ósea asociada con el cáncer de mama en un sujeto que lo requiera, en donde el antagonista de activina-ActRIIa es una proteína de fusión ActRIIa-Fc que comprende un polipéptido seleccionado entre:
- 5 a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;
- b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;
- c. un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2;
- d. un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3;
- 10 e. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12;
- f. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12; y
- g. un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 12.
- 15 2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.
3. La composición para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una o varias de las siguientes características:
- i. se une a un ligando de ActRIIa con una  $K_D$  de al menos  $10^{-7}$  M; y
- ii. inhibe la señalización de ActRIIa en una célula.
- 20 4. La composición para uso según la reivindicación 1, 2 o 3, en la que dicha proteína de fusión ActRIIa-Fc incluye uno o varios residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente orgánico derivatizante.
5. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína de fusión ActRIIa-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc comprende tres o más restos de ácido siálico.
- 25 6. La composición para uso según la reivindicación 5, en la que la proteína de fusión ActRIIa-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 30 7. La composición para uso según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que la proteína de fusión ActRIIa-Fc comprende entre tres y cinco restos de ácido siálico.
8. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una semivida en suero de 15 a 40 días en seres humanos normales y sanos.
9. La composición para uso según la reivindicación 6, que es para administrar al paciente con una frecuencia no superior a una vez por semana, una vez al mes o una vez cada tres meses.
- 35 10. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el paciente está recibiendo o ha recibido el año anterior a la administración de la proteína de fusión ActRIIa-Fc, una terapia ósea contra la resorción.
11. La composición para uso según la reivindicación 10, en la que el agente antiresorción es un agente bisfosfonato.
- 40 12. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en la que el ser humano es una mujer con uno o varios factores de riesgo de cáncer de mama.
13. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al paciente se le administra adicionalmente radioterapia, terapia endocrina o un agente citotóxico.
- 45 14. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el cáncer es metastásico.
15. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el sujeto tiene riesgo de

desarrollar un cáncer metastásico.

16.La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína de fusión ActR11a-Fc consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 7.

5 17.La composición para uso según la reivindicación 16, en la que la proteína de fusión ActR11a-Fc consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 7.

18.La composición para uso según la reivindicación 17, en la que la proteína de fusión ActR11a-Fc consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

10 19.El uso de un antagonista de activina-ActR11a para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de metástasis de cáncer de mama o pérdida ósea relacionada con el cáncer de mama en un sujeto, en donde el antagonista de activina-ActR11a es una proteína de fusión ActR11a-Fc que comprende un polipéptido seleccionado entre:

a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 2 o 3;

c. un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2;

15 d. un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3;

e. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12;

f. un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 7 o 12;

g. un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 12.

20 20.El uso según la reivindicación 19, en el que la proteína de fusión ActR11a-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y en donde la proteína de fusión ActR11a-Fc comprende tres o más restos de ácido siálico.

25 21.El uso según la reivindicación 20, en el que la proteína de fusión ActR11a-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

22.El uso según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en el que la proteína de fusión ActR11a-Fc comprende entre tres y cinco restos de ácido siálico.

23.El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el cáncer es metastásico.

30 24.El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el sujeto tiene riesgo de desarrollar un cáncer metastásico.

25.El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que la proteína de fusión ActR11a-Fc consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 7.

26.El uso según la reivindicación 25, en el que la proteína de fusión ActR11a-Fc consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 7.

35 27.El uso según la reivindicación 26, en el que la proteína de fusión ActR11a-Fc consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

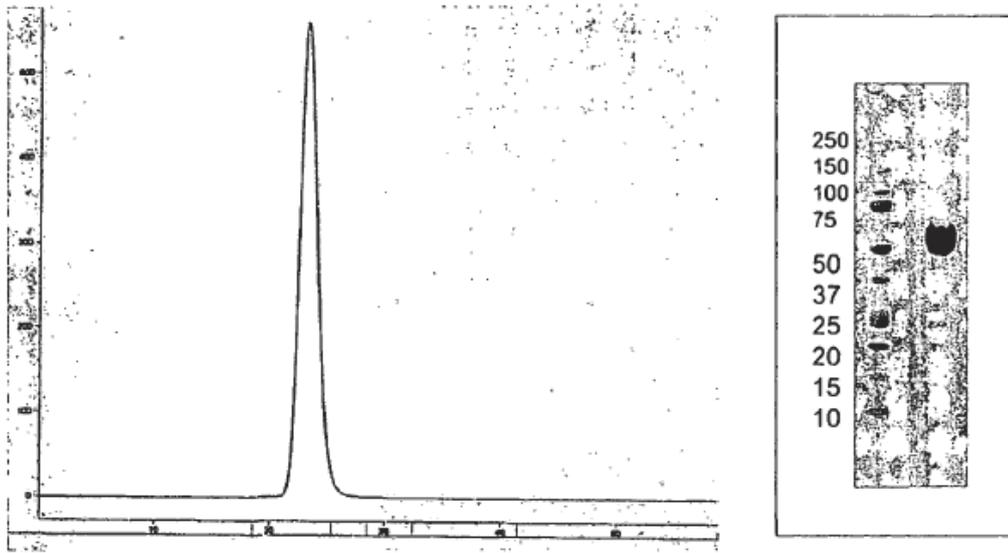


Figura 1

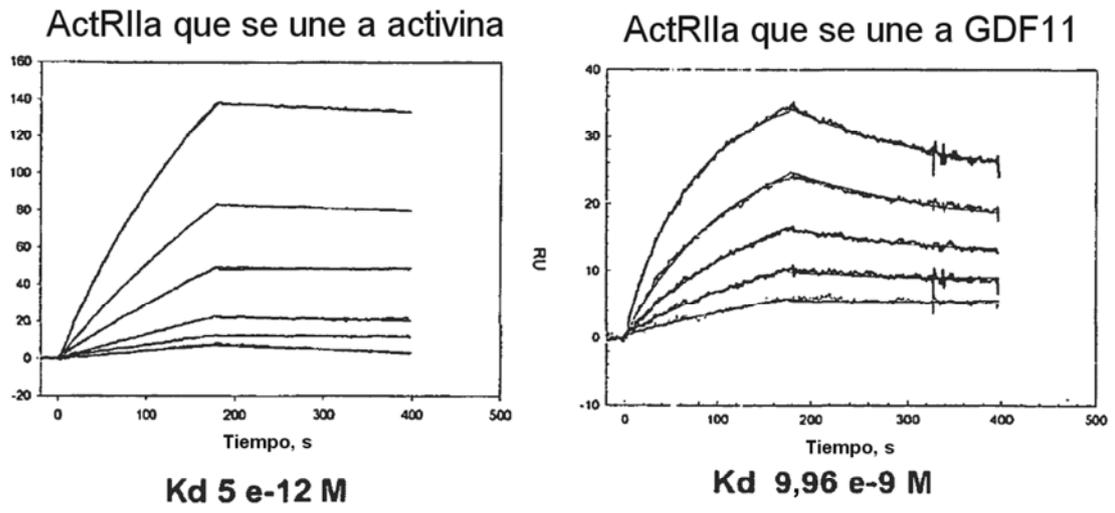
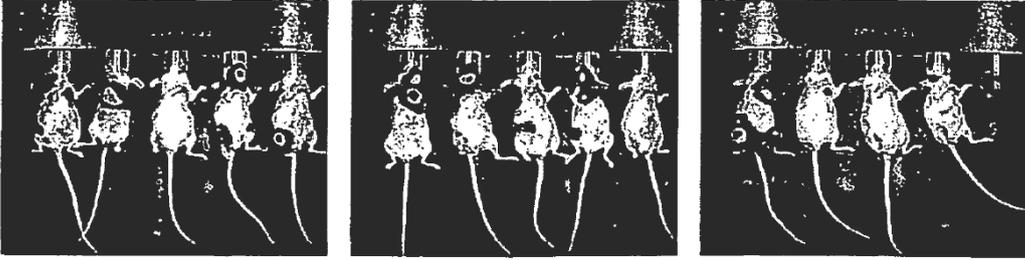


Figura 2

Metástasis de cáncer de mama (células MDA-MB-231)

Testigo PBS (14 ratones)



Tratamiento con ActR11a-mFc (12 ratones)

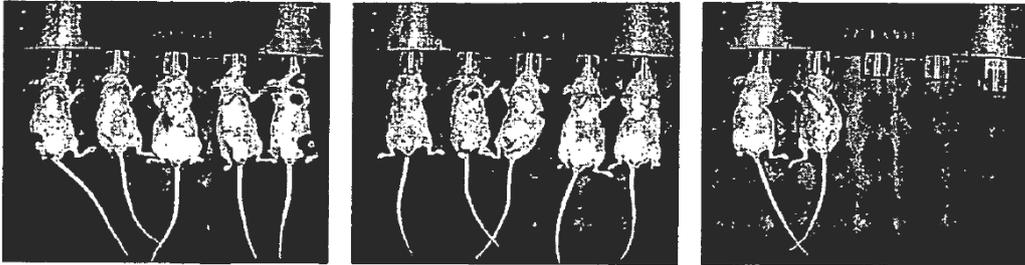


Figura 3