

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 005**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2005 E 05775451 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1771470**

54 Título: **Polipéptidos del receptor ACTRII, procedimientos y composiciones**

30 Prioridad:

23.07.2004 US 590765 P

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

18.10.2013

73 Titular/es:

**ACCELERON PHARMA INC. (100.0%)
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**KNOFF, JOHN y
SEEHRA, JASBIR**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 426 005 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

Polipéptidos del receptor ACTRII, procedimientos y composiciones.

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/590.765, presentada el 23 de julio de 2004.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran diversidad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y especificación de tejido, y pueden influenciar una diversidad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis, y diferenciación celular epitelial. La familia se divide en dos ramas generales: las ramificaciones BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, aunque complementarios. Mediante la manipulación de la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, con frecuencia es posible originar cambios fisiológicos importantes en un organismo. Por ejemplo, las crías de ganado Piedmontese y Belgian Blue llevan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también denominada miostatina) que origina un marcado aumento en la masa muscular. Grobet y col., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4. Además, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con un aumento de la masa muscular, y al parecer, una fuerza excepcional. Schuelke y col., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

[0003] Los cambios en músculo, hueso, cartílago y otros tejidos pueden lograrse mediante una señalización de agonización o antagonización que está mediada por un miembro de la familia TGF-beta adecuado. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes que funcionen como reguladores potentes de señalización de TGF-beta.

[0004] El documento WO 2004/039948 A (WYETH) 13 de mayo de 2004 se refiere a procedimientos y composiciones para inhibir la actividad del factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF-8) *in vitro* e *in vivo*, que puede usarse para diagnosticar, prevenir o tratar trastornos degenerativos de homeostasis muscular, ósea o de la glucosa.

[0005] Gray PC y col., J Biol Chem. 2000, 275(5): 3206-3212 se refieren a la identificación de un sitio de unión en el receptor de activina de tipo II para activina e inhibina, y describen un grupo de tres residuos hidrófobos (Phe(42), Trp(60) y Phe(83)) que, cuando mutan individualmente a alanina en el contexto del receptor de longitud completa, provocan la interrupción de la unión de activina e inhibina a ActRII.

[0006] Thompson TB y col., EMBO J. 2003, 22(7): 1555-1566 se refieren a estructuras de un complejo de ActRIIB:activina A que revela un modo de unión novedoso para las interacciones del ligando TGF-beta:receptor. El ActRIIB se une a los bordes externos de las regiones de dedo de activina, con los dos receptores yuxtapuestos en estrecha proximidad, en un modo que difiere de la unión de TGF-beta3 a receptores de tipo II.

45 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

[0008] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona polipéptidos ActRII. Dichos polipéptidos ActRII pueden usarse para el tratamiento de una diversidad de trastornos o afecciones, en particular, trastornos musculares y neuromusculares (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular), crecimiento no deseado de hueso/cartílago, trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad), trastornos metabólicos (por ejemplo, diabetes tipo 2), trastornos neurodegenerativos. En realizaciones específicas, los polipéptidos ActRII de la invención (por ejemplo, polipéptidos ActRII solubles) pueden antagonizar generalmente un receptor ActRII (por ejemplo ActRIIA o ActRIIB) en cualquier proceso asociado con la actividad de ActRII. Opcionalmente, los polipéptidos ActRII de la invención pueden estar diseñados para antagonizar preferiblemente uno o más ligandos de los receptores ActRII, tal como GDF8 (también denominado miostatina), GDF11, activina, Nodal y BMP7 (también denominado OP-1), o, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales. Los ejemplos de polipéptidos ActRII incluyen los polipéptidos ActRII de origen natural, así como variantes funcionales de los mismos.

[0009] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido ActRII soluble (por ejemplo ActRIIA o ActRIIB) que se une a un ligando ActRII, tal como GDF8, GDF11, activina, BMP7 o nodal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el polipéptido ActRII soluble se une a un ligando ActRII con un Kd menor de 10 micromolar o menor de 1 micromolar, 100, 10 ó 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActRII soluble inhibe la señalización ActRII, tal como los eventos de transducción de

señal intracelular desencadenados por un ligando ActRII. Un polipéptido ActRII soluble para su uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de los desvelados en este documento, tales como un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1-2 y 9-12, o que tiene una secuencia aminoacídica que es al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1-2 y 9-12. Un polipéptido ActRIIBA soluble puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRII natural, tal como uno que comprende 10, 20 ó 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1-4 y 9-12, o una secuencia de la SEQ ID NO: 1 ó 2, que carece de 10 a 15 aminoácidos C-terminal (la "cola"). Un polipéptido ActRII soluble puede incluir una o más alteraciones en la secuencia aminoacídica (por ejemplo en el dominio de unión a ligando) con respecto a un polipéptido ActRII de origen natural. La alteración en la secuencia aminoacídica, por ejemplo, puede alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariótica, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con respecto al polipéptido ActRII de origen natural. Un polipéptido ActRII soluble puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRII (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRII) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseada, tal como farmacocinéticas mejoradas, purificación más fácil, dirección a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar uno o más de la estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución en tejido, formación de complejos de proteína, multimerización de proteína de fusión y/o purificación. Una proteína de fusión ActRII soluble puede incluir un dominio de inmunoglobulina Fc (de tipo natural o mutante) o una albúmina sérica. En un caso preferido, una fusión ActRU-Fc comprende un enlazador relativamente no estructurado entre el dominio Fc y el dominio ActRII extracelular. Este enlazador no estructurado puede corresponder rigurosamente a una región no estructurada de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIA o ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de una estructura secundaria. Un enlazador puede tener alto contenido de residuos de glicina y prolina y, por ejemplo, puede contener secuencias de repetición de treonina/serina y glicinas (por ejemplo repeticiones TG₄ o SG₄). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una secuencia de polihistidina, y una fusión GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRII soluble incluye uno o más residuos aminoacídicos modificados seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica, y un aminoácido conjugado a un agente de derivación orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado con ActRII. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está substancialmente libre de pirógenos. En general, se prefiere que una proteína ActRII se exprese en una línea celular de mamífero que medie una glucosilación natural adecuada de la proteína ActRII, para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune no favorable en el paciente. Las líneas celulares humanas y CHO se han usado de forma exitosa, y se espera que sean útiles otros vectores de expresión de mamíferos comunes.

[0010] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona productos farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en este documento y etiquetados para su uso en promover el crecimiento de un tejido o disminuir o prevenir la pérdida de un tejido en un mamífero. Los tejidos ejemplares incluyen hueso, cartílago, músculo, grasa y neuronas.

[0011] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos ActRII solubles que comprenden un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, unión a GDF8) de un ActRII. Dichos dominios de unión a ligando alterados de un receptor ActRII comprenden una o más mutaciones en residuos aminoacídicos, tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano. Dichos dominios de unión a ligando alterados de un receptor ActRII comprenden una o más mutaciones en residuos aminoacídicos, tales como E38, E40, R41, K56, R57, Y61, K65, K75, W79, L80, D81, 183 y F102 de ActRIIA humano. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8/GDF11 relativo al dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRII. Como ilustración, estas mutaciones se demuestran en este documento para aumentar la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 (y por lo tanto, presumiblemente, GDF8) con respecto a activina (presentado con respecto a ActRIIB): K74Y, K74F, K74I y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto inverso, aumentando la proporción de unión a activina con respecto a GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión general (GDF11 y activina) puede aumentarse mediante la inclusión de la región de la "cola" o, presumiblemente, una región enlazadora no estructurada, y también a través del uso de una mutación, tal como A64R (de origen natural) o K74A. Otras mutaciones que originaron una disminución general en la afinidad de unión a ligando, incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones pueden combinarse para lograr los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan a la proporción de unión a GDF11:Activina tienen un efecto negativo general en la unión al ligando y, por lo tanto, éstas se pueden combinar con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando.

[0012] Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una proporción de K_d para la unión de activina a K_d para la unión de GDF8 que es de al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor con respecto a la proporción del dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una proporción de IC₅₀ para inhibir la activina con respecto a IC₅₀ para inhibir GDF8/GDF11 que es al menos el 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor con respecto al dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de

unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con un IC_{50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor que el IC_{50} para inhibir activina. Estos polipéptidos ActRII solubles pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (ya sea tipo natural o mutante). En ciertos casos, los polipéptidos ActRII solubles en cuestión son antagonistas (inhibidores) de GDF8/GDF11.

[0013] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRII soluble, que no codifica en polipéptido ActRII completo. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de codificación para un polipéptido ActRII soluble, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un ActRII y una secuencia que puede codificar parte o todo el dominio de transmembrana y/o el dominio citoplásmico de un ActRII, pero codificar un codón de detención colocado dentro del dominio de transmembrana o el dominio citoplásmico, o colocado entre el dominio extracelular y el dominio de transmembrana o dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia polinucleotídica ActRIIB de longitud completa, tal como SEQ ID NO: 7 u 8, 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' o por el contrario colocado de tal forma que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente condensado a una parte truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos desvelados en este documento pueden enlazarse de forma operativa a un promotor para su expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

[0014] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para elaborar un polipéptido ActRII soluble. Un procedimiento de este tipo puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo SEQ ID NO: 5 ó 6) desvelados en este documento en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Un procedimiento de este tipo puede comprender; a) cultivar una célula en las condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRII soluble, donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de ActRII soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRII soluble ya expresado. Los polipéptidos ActRII solubles pueden recuperarse en forma de fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener una proteína a partir de cultivos celulares.

[0015] En ciertos aspectos, un polipéptido ActRII desvelado en este documento puede usarse en un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado con pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente. Dichos trastornos incluyen atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y un trastorno de desgaste muscular (por ejemplo, caquexia, anorexia, síndrome DMD, síndrome BMD, síndrome de desgaste por SIDA, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares, enfermedades de neurona motora, enfermedades de la unión neuromuscular y miopatías inflamatorias). Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que necesita del mismo, una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII soluble.

[0016] En ciertos aspectos, un polipéptido ActRII soluble desvelado en este documento puede usarse en un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno asociado con neurodegeneración. Dichos trastornos incluyen enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington (EH). Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que necesite del mismo una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII soluble.

[0017] En ciertos aspectos, un polipéptido ActRII soluble desvelado en este documento puede usarse en un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno asociado con un crecimiento y diferenciación celular anormal. Dichos trastornos incluyen inflamación, alergia, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y tumores. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que necesite del mismo una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII soluble. Una proteína ActRII de unión a activina selectiva puede ser particularmente útil para el tratamiento de un cáncer dependiente de activina, tal como un cáncer de ovario.

[0018] En ciertos aspectos, el polipéptido ActRII soluble desvelado en este documento puede usarse en un procedimiento para disminuir el contenido de grasa corporal o reducir la tasa de aumento de contenido de grasa corporal, y para tratar un trastorno asociado con ganancia de peso corporal no deseada, tal como obesidad, diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI), enfermedad cardiovascular, cáncer, hipertensión, osteoartritis, ictus, problemas respiratorios y enfermedad de la vesícula biliar. Estos procedimientos pueden comprender administrar a un sujeto que necesita del mismo una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII soluble.

[0019] En ciertos aspectos específicos, un polipéptido ActRII soluble desvelado en este documento puede usarse en un procedimiento para tratar un trastorno asociado con una actividad anormal de GDF8. Dichos trastornos incluyen trastornos metabólicos, tales como diabetes de tipo 2, tolerancia de glucosa alterada, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), y resistencia a insulina inducida por trauma (por ejemplo quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos de tejido adiposo (por ejemplo, obesidad), distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia de órganos; debilidad; síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, y otros síndromes de desgaste muscular, osteoporosis; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; fracturas relacionadas

con osteoporosis, masa ósea de bajo nivel debido a terapia glucocorticoide crónica, fallo gonadal prematuro, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. El procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que necesita del mismo una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII soluble.

[0020] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento para identificar un agente que estimula el crecimiento de un tejido, tal como hueso, cartílago, músculo, grasa y neuronas. El procedimiento comprende: a) identificar un agente de prueba que se une a un dominio de unión a un ligando de un polipéptido ActRII de forma competitiva con un polipéptido ActRII soluble; y b) evaluar el efecto del agente en el crecimiento del tejido.

[0021] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para antagonizar la actividad de un polipéptido ActRII o un ligando ActRII (por ejemplo, GDF8, GDF11, activina, BMP7 y Nodal) en una célula. Los procedimientos comprenden poner en contacto la célula con un polipéptido ActRII soluble. Opcionalmente, la actividad del polipéptido ActRII o el ligando ActRIIB se supervisa mediante una transducción de señalización mediada por el complejo de ActRII/ligando ActRII, por ejemplo, supervisando la proliferación celular. Las células de los procedimientos incluyen un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adipocito, una célula muscular y una célula neuronal.

[0022] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona usos de un polipéptido ActRII soluble para elaborar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en este documento.

Breve Descripción de los Dibujos

[0023]

La figura 1 muestra una secuencia de polipéptido soluble ActRIIA humano (extracelular) (SEQ ID NO: 1). La "cola" C-terminal está subrayada.

La figura 2 muestra una secuencia de polipéptido soluble ActRIIB humano (extracelular) (SEQ ID NO: 2). La "cola" C-terminal está subrayada.

La figura 3 muestra una secuencia de proteína precursora ActRIIA humana (SEQ ID NO: 3). El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en letras negrita (también denominado como SEQ ID NO: 1); y los sitios de glucosilación enlazados a N potenciales están en un cuadro.

La figura 4 muestra una secuencia de proteína precursora ActRIIB humana (SEQ ID NO: 4). El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en letras negrita (también denominado como SEQ ID NO: 2); y los sitios de glucosilación enlazados a N potenciales están en un cuadro.

La figura 5 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido soluble ActRIIA humano (extracelular), designado como SEQ ID NO: 5.

La figura 6 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido soluble ActRIIB humano (extracelular), designado como SEQ ID NO: 6.

La figura 7 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora ActRIIA humana, designada como SEQ ID NO: 7.

La figura 8 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora ActRIIB humana, designada como SEQ ID NO: 8.

La figura 9 muestra la expresión de los dominios extracelulares (solubles) de ActRIIA o ActRIIB. Las construcciones que expresan dominios extracelulares humanos de ActRIIA o ActRIIB se hicieron con cada una de las tres secuencias señal.

La figura 10 muestra tres polipéptidos ActRIIB solubles con diversas secuencias señal, SEQ ID NOs: 9-11.

La figura 11 muestra un polipéptido ActRIIA soluble con su secuencia señal original, SEQ ID NO: 12.

La figura 12 muestra el diseño de las fusiones Fc de los polipéptidos ActRIIA o ActRIIB. Se muestran la secuencia enlazadora flexible y la secuencia Fc (SEQ ID NO: 13). Pueden hacerse mutaciones en uno más de los residuos aminoácidos de la secuencia Fc. Los ejemplos de dichos residuos para las mutaciones están subrayados, y se denominan Asp-265, lisina-322 y Asn-434.

La figura 13 muestra el bolsillo de unión al ligando de un polipéptido ActRIIB. Los ejemplos de residuos aminoácidos en el bolsillo de unión a ligando se muestran como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101. Los

polipéptidos ActRIIB de la invención pueden comprender mutaciones en uno o más de estos residuos aminoacídicos.

5 La figura 14 muestra una alineación de los dominios extracelulares de ActRIIA y ActRIIB, demostrando en este documento que las posiciones de las mutaciones, en ActRIIB, afectan a la unión al ligando. La alineación muestra que la posición de estas mutaciones se conserva en ActRIIA.

10 La figura 15 muestra una representación esquemática para el Ensayo del Gen Informador A-204. La figura muestra el vector informador: pGL3 (CAGA)₁₂ (descrito en Dennler y col, 1998, EMBO 17: 3091-3100). El motivo CAGA₁₂ está presente en los genes que responden a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para factores de señalización a través de Smad2 y 3.

15 La figura 16 muestra los efectos de diversas mutaciones en ActRIIB-Fc en un GDF-11 en un Ensayo del Gen Informador A-204. La construcción A64 antecedente mostró un efecto mínimo en la actividad de GDF-11. La mutación A64K (también una forma de origen natural) provocó un aumento sustancial en la inhibición de GDF-11, y una combinación de la mutación A64K con la adición de los 15 aminoácidos C-terminal del dominio extracelular (la "cola" de 15 aminoácidos) produjo una inhibición incluso más potente de la actividad de GDF-11.

20 La figura 17 muestra los efectos de diversas mutaciones en ActRIIB-Fc sobre una Activina A, Ensayo del Gen Informador A-204. La construcción A64 antecedente mostró un efecto mínimo sobre la actividad de la Activina A. La mutación K74A provocó un aumento sustancial de la inhibición de Activina A. Una muestra de control carente de Activina A no mostró ninguna actividad.

Descripción Detallada de la Invención

25 1. Revisión general

30 **[0024]** La presente invención se refiere a polipéptidos ActRII. Como se usa en este documento, el término "ActRII" se refiere a una familia de proteínas de tipo II del receptor de activina (ActRII) y proteínas relacionadas con ActRIIB, obtenidas de cualquier especie. La referencia a ActRII en este documento se entenderá como una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente, incluyendo ActRIIA (también conocido como ActRII) y ActRIIB. Los miembros de la familia ActRII generalmente son todas las proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región con alto contenido en cisteína, un dominio de transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad de serina/treonina cinasa predicha. Las secuencias aminoacídicas de la proteína precursora ActRIIA humana y la proteína precursora ActRIIB se ilustran en la figura 3 (SEQ ID NO: 3) y en la figura 4 (SEQ ID NO: 4), respectivamente.

40 **[0025]** La expresión "polipéptido ActRII" se usa para referirse a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRII, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRII incluyen polipéptidos obtenidos de la secuencia de cualquier ActRII conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente el 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRII, y preferiblemente al menos de aproximadamente el 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o mayor de identidad.

45 **[0026]** La invención se refiere a polipéptidos ActRII solubles. Como se describe en este documento, la expresión "polipéptido ActRII soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRII. La expresión "polipéptido ActRII soluble", como se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRII, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRII se une a un ligando y es generalmente soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRII solubles incluyen los polipéptidos solubles ActRIIA y ActRIIB ilustrados en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) y la figura 2 (SEQ ID NO: 2), respectivamente. Otros ejemplos de polipéptidos ActRII solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRII, por ejemplo, las secuencias ilustradas en la figura 10 (SEQ ID NO: 9-11) y la figura 11 (SEQ ID NO: 12). La secuencia señal puede ser una secuencia señal nativa de un ActRII, o una secuencia señal de otra proteína, tal como una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno (TPA) o una secuencia señal de melitina de miel de abeja (HBM).

60 **[0027]** Las señales TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa de tipo I y II, que fosforilan y activan corriente abajo las proteínas Smad tras la estimulación con ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son todas proteínas transmembrana, compuestos por un dominio extracelular de unión a ligando con una región con alto contenido en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con una especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores de tipo II son necesarios para unir ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y tipo II forman un complejo estable después de la unión al ligando, dando como resultado una fosforilación de receptores de tipo I por receptores de tipo II.

[0028] Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como los receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65: 973-982; Attisano y col., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con otras diversas proteína de la familia TGF- β , incluyendo BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita y col., 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 y col., 2002, Genes Dev. 16: 2749-54).

[0029] En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a la antagonización de un ligando de los receptores ActRII (también denominados como un ligando ActRII) con un polipéptido ActRII en cuestión (por ejemplo, un polipéptido ActRII soluble). Por lo tanto, las composiciones de la presente invención son útiles para tratar trastornos asociados con una actividad anormal de uno o más ligandos de los receptores ActRII. Los ligandos ejemplares de los receptores ActRII incluyen algunos miembros de la familia TGF- β , tales como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7. Estos ligandos de receptores ActRII se describen en más detalle a continuación.

[0030] Las activinas son factores de crecimiento de polipéptidos dimericos y pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Existen tres activinas (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades B estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$). En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células de ovario y placenta, soportar la supervivencia celular neuronal, influenciar positiva o negativamente el progreso del tipo ciclo celular, dependiendo del tipo celular, e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibio (DePaolo y col., 1991, Proc SocEp Biol Med. 198: 500-512; Dyson y col., 1997, Curr Biol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963). Además, se descubrió que el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata y col., 1988, PNAS, 85: 2434). Esto sugiere que la activina A actúa como un regulador natural de la eritropoyesis en médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina se antagoniza a través de su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina evita la secreción y la síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de activina y/o unirse a activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP), α_2 -macroglobulina, Cerberus y endoglina, que se describen a continuación.

[0031] Las proteínas nodales tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y el endodermo, así como la organización posterior de estructuras axiales, tales como estómago y corazón en una embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en el desarrollo de un embrión de vertebrado contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la placa notocorda y precorda al mismo tiempo que recluta las células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal aparece para señalar a través de receptores tanto de tipo I como de tipo II y efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma y col., Genes Cells. 2002, 7: 401-12). Se sugiere que los ligandos Nodal interactúan con sus cofactores (por ejemplo, cripto) para activar los receptores de tipo I y tipo II de activina, que fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos eventos importantes para el embrión vertebrado temprano, incluyendo la formación del mesodermo, patrón anterior y especificación de eje izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización Nodal activa pAR-3-Lux, un informador de luciferasa mostrado previamente para responder específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal no tiene la capacidad de inducir pTlx2-Lux, un informador que responde específicamente a las proteínas morfogenéticas de hueso. Los resultados recientes proporcionan una evidencia bioquímica directa de que la señalización Nodal está mediada por tanto la ruta activina-TGF-beta, Smads, Smad2 como Smad3. La evidencia adicional ha mostrado que la proteína cripto extracelular es necesaria para la señalización Nodal, haciéndola distinta de la señalización de activina o TGF-beta.

[0032] El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa musculoesquelética. GDF8 se expresa altamente en el desarrollo de músculo esquelético adulto. La mutación nula de GDF8 en ratones transgénicos está caracterizada por una hipertrofia e hiperplasia marcada del músculo esquelético (McPherron y col., Nature, 1997, 387: 83-90). Aumentos similares en masa musculoesquelética son evidentes en mutaciones de origen natural de GDF8 en ganado (Ashmore y col., 1974, Growth, 38: 501-507; Swatland y Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38: 752-757; McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 12457-12461; y Kambadur y col., Genome Res., 1997, 7: 910-915) y, sorprendentemente en seres humanos (Schuelke y col., N Engl J Med 2004; 350: 2682-8). Los estudios también han mostrado que el desgaste muscular asociado con infección por VIH en seres humanos está acompañada por aumentos en la expresión de proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid y col., PNAS, 1998, 95: 14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas de músculo (por ejemplo creatina cinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos (documento WO 00/43781). El propéptido GDF8 puede unirse de forma no covalente al dímero de dominio GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono y col. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield y col. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; y Brown y col. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o proteínas estructuralmente relacionadas y que inhiben su actividad biológica incluyen folistatina y potencialmente proteínas relacionadas con folistatina (Gamer y col. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

- 5 **[0033]** El factor 11 de crecimiento y diferenciación (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron y col., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en el brote de la cola, brote de la extremidad, arcos maxilares y mandibulares, y ganglios de raíz dorsal durante el desarrollo de ratones (Nakashima y col., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 desempeña una función única en la generación de patrones tanto de tejido mesodérmicos como neurales (Gamer y col., 1999, Dev Biol., 208: 222-32). GDF11 mostró ser un regulador negativo de condrogénesis y miogénesis en el desarrollo de extremidades de pollos (Gamer y col., 2001, Dev Biol. 229: 407-20). La expresión de GDF11 en músculos también sugiere su función en la regulación del crecimiento muscular de una forma similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. De forma interesante, se descubrió que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu y col., 2003, Neuron. 37: 197-207). Por lo tanto, GDF11 puede tener aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de enfermedades, tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo esclerosis lateral amiotrófica).
- 10
- 15 **[0034]** La proteína morfogenética de hueso (BMP7), también llamada proteína-1 osteogénica (OP-1), se conoce bien para inducir la formación de cartilago y hueso. Además, BMP7 regula una amplia formación de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 puede ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se descubrió que BMP7 desempeña una función importante en la regulación de calcio y en la homeostasis de huesos. Al igual que la activina, BMP7 se une a receptores de tipo II, ActRIIA e IIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan distintos receptores de tipo I en los complejos de receptor heteromérico. El receptor de tipo I BMP7 mayor observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina provocaron distintas respuestas biológicas y activaron diferentes rutas Smad (Macias-Silva y col., 1998, J Biol Chem. 273: 25628-36).
- 20
- 25 **[0035]** La presente invención se refiere al uso de ciertos polipéptidos ActRII (por ejemplo polipéptidos ActRII solubles) para antagonizar receptores ActRII generalmente, en cualquier proceso asociado con la actividad de ActRII. Opcionalmente, los polipéptidos ActRII de la invención pueden antagonizar uno o más ligandos de los receptores ActRIIB, tales como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7 y, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales.
- 30
- 35 **[0036]** Por lo tanto, la presente invención contempla el uso de polipéptidos ActRII en el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones que están asociadas con una actividad anormal de un ActRII o un ligando ActRII. ActRII y los ligandos ActRII están implicados en la regulación de muchos procesos biológicos importantes. Debido a sus funciones clave en estos procesos, pueden ser objetivos deseables para la intervención terapéutica. Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos ActRII (por ejemplo polipéptidos ActRII solubles) para tratar trastornos o afecciones humanas o animales. Los ejemplos de dichos trastornos o afecciones incluyen, pero sin limitación, trastornos metabólicos, tales como diabetes tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por trauma (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos de tejido adiposo (por ejemplo obesidad); trastornos musculares y neuromusculares, tales como distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia de órganos; debilidad, síndrome de túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular. Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en mujeres de edad avanzada y/o posmenopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, osteoartritis y fracturas relacionadas con la osteoporosis. Aún ejemplos adicionales incluyen masa de hueso de bajo nivel debido a terapia glucocorticoide crónica, fallo gonadal prematuro, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Estos trastornos y afecciones se describen a continuación en la sección "Usos Terapéuticos Ejemplares".
- 40
- 45
- 50 **[0037]** Los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se analizan a continuación o en cualquier parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional para el practicante en la descripción de las composiciones y procedimientos de la invención, y de cómo elaborarlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en que se usa el término.
- 55
- 60 **[0038]** "Alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado de error aceptable para la cantidad de medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Típicamente, los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor o intervalo de valores determinados.
- 65 **[0039]** Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, las expresiones "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente 5 veces, y más preferentemente 2 veces de un valor determinado. Las cantidades numéricas proporcionadas en este documento son aproximadas, a menos que se indique otra cosa, lo que significa que las expresiones "alrededor de" o "aproximadamente" pueden deducirse cuando no se manifieste de manera expresa.

[0040] Los procedimientos de la invención pueden incluir etapas para comparar secuencias entre sí, incluyendo una secuencia tipo natural para uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones normalmente comprenden alineaciones de secuencias poliméricas, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencia y/o algoritmos que se conocen bien en la técnica (por ejemplo BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). Los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que en dichas alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o eliminación de residuo, la alineación de secuencia introducirá una "brecha" (normalmente representada por un punto, o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el residuo insertado o eliminado.

[0041] El término "homólogo", en todas sus formas gramáticas y variaciones de delecteo, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen de evolución común", incluyendo proteínas de superfamilias en la misma especie de organismos, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Dichas proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen una homología de secuencia, como se refleja a través de su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

[0042] La expresión "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos que pueden o no compartir un origen de evolución común.

[0043] Sin embargo, en uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con adverbio, tal como "altamente", puede referirse a una similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen de evolución común.

2. Polipéptidos ActRII

[0044] La invención se refiere a polipéptidos ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRII solubles). Preferiblemente, los fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas tienen actividades biológicas similares o iguales de sus polipéptidos ActRII de tipo natural correspondientes. Por ejemplo, un polipéptido ActRII de la invención puede unirse a e inhibir la función de un ActRII y/o una proteína de ligando ActRII (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido ActRII modula el crecimiento de tejidos, tales como huesos, cartílago, músculo, grasa y/o neuronas. Los ejemplos de polipéptidos ActRII incluyen un polipéptido precursor ActRIIA humano (SEQ ID NO: 3), polipéptidos de precursor ActRIIB humanos (por ejemplo SEQ ID NO: 4), polipéptidos ActRIIA humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1 y 12), polipéptidos ActRIIA humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 y 9-11).

[0045] En ciertas realizaciones, los fragmentos aislados de los polipéptidos ActRII pueden obtenerse clasificando polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica el polipéptido ActRII (por ejemplo, uno de SEQ ID NOS: 1-2 y 9-12). Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como química f-Moc o t-Boc de fase sólida Merrifield convencional. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o mediante síntesis química) y probarse para identificar los fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRII o un ligando ActRII.

[0046] En ciertos casos, una variante funcional de los polipéptidos ActRII tiene una secuencia aminoacídica que es al menos el 75% idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada entre SEQ ID NOS: 1-2 y 9-12. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia aminoacídica al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o el 100% idéntica a una secuencia aminoacídica seleccionada entre SEQ ID NOS: 1-2 y 9-12.

[0047] En ciertas realizaciones, la presente invención contempla la elaboración de variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRII para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ejemplo vida útil *ex vivo* y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos ActRII modificados, cuando están diseñados para retener al menos una actividad de la forma de origen natural de los polipéptidos ActRII, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRII de origen natural. Los polipéptidos ActRII modificados también pueden producirse, por ejemplo, mediante sustitución, eliminación o adición amoniacídica. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tengan un efecto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son los que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia aminoacídica de un polipéptido ActRII da como resultado un homólogo funcional puede determinarse fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRII variante para producir una respuesta en las células de un modo similar al polipéptido ActRII de tipo natural.

[0048] En ciertas realizaciones específicas, la presente invención contempla elaborar mutaciones en el dominio extracelular (también denominado como dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRII, de modo que el polipéptido ActRII variante (o mutante) tenga actividades de unión a ligandos alteradas (por ejemplo afinidad de

unión o especificidad de unión). En ciertos casos, dichos polipéptidos ActRII variantes tienen una afinidad de unión alterada (elevada o reducida) para un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos ActRII variantes tienen una especificidad de unión alterada para sus ligandos.

5 **[0049]** Por ejemplo, el polipéptido ActRII variante se une preferiblemente a un ligando específico (por ejemplo, GDF8). Por ejemplo, los residuos aminoacídicos de la proteína ActRIIB, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101 (mostrados en la figura 13), están en el bolsillo de unión a ligando y median la unión a sus ligandos, tales como activina y GDF8. Por lo tanto, la presente invención proporciona un dominio de unión al ligando alterado (por ejemplo dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRII, que comprende una o más mutaciones en los residuos aminoacídicos. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado puede tener un aumento de la selectividad para un ligando tal como GDF8 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRII. Como ilustración, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando para GDF8 con respecto a activina. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una proporción de K_d para la unión de activina a K_d para la unión de GDF8 que es de al menos el 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor con relación a la proporción para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una proporción de IC_{50} para la inhibición de activina con respecto a IC_{50} para la inhibición de GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces más con respecto al dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8 con un IC_{50} de al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menor que el IC_{50} para la inhibición de activina.

20 **[0050]** Como un ejemplo específico, el residuo aminoacídico cargado en forma positiva Asp (D80) del dominio de unión al ligando de ActRIIB, puede mutarse a un residuo aminoacídico diferente, de modo que el polipéptido ActRII variante se una preferiblemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D60 se cambia a un residuo aminoacídico seleccionado entre el grupo que consiste en: un residuo aminoacídico no cargado, un residuo aminoacídico negativo, y un residuo aminoacídico hidrófobo. Como se reconocerá por un experto en la técnica, la mayor parte de las mutaciones descritas, variantes o modificaciones pueden hacerse al nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccional o síntesis química. Dichas técnicas se conocen bien en la técnica.

30 **[0051]** En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRII, para alterar la glucosilación del polipéptido. Los sitios de glucosilación ejemplares en polipéptidos ActRIIA y ActRIIB se ilustran en las figuras 3 y 4, respectivamente. Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno más sitios de glucosilación, tal como sitios de glucosilación ligados a O o ligados a N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación ligados a asparagina, generalmente comprenden una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por las enzimas de glucosilación celulares adecuadas. La alteración también puede elaborarse mediante la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRII de tipo natural (para sitios de glucosilación ligados a O). Una diversidad de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones aminoacídicas de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o eliminación de aminoácido en la segunda posición) da como resultado una no glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en un polipéptido ActRII, es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRII. Dependiendo del modo de acoplamiento usando, el azúcar o azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilos 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 glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306. La eliminación de uno o más restos de carbohidratos presentes en un polipéptido ActRII se puede realizar químicamente y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRII al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace ((N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando al mismo tiempo intacta la secuencia aminoacídica. La desglucosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y por Edge y col. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de los restos de carbohidratos en los polipéptidos ActRII se puede lograr a través del uso de una diversidad de endo y exoglucosidasas como se describe por Thotakura y col. (1987) Meth. Enzymol. 138: 350. La secuencia de un polipéptido ActRII puede ajustarse, según sea adecuado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y plantas pueden introducir patrones de glucosilación diferentes que pueden verse afectados por la secuencia aminoacídica del péptido. En general, las proteínas ActRII para su uso en humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona la glucosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que también sean útiles otras líneas celulares de expresión de mamíferos.

65 **[0052]** Esta divulgación contempla adicionalmente un procedimiento para generar mutantes, particularmente conjuntos de mutantes de combinación de un polipéptido ActRII, así como mutantes de truncado; las agrupaciones de mutantes de combinación son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito de clasificar dichas bibliotecas de combinación puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptido

ActRII que pueden actuar como agonistas o antagonistas o, como alternativa, que poseen actividades novedosas en conjunto. A continuación, se proporciona una diversidad de ensayos de clasificación, y dichos ensayos pueden usarse para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRII puede clasificarse por su capacidad de unirse a un polipéptido ActRII, para evitar la unión de un ligando ActRII a un polipéptido ActRII.

[0053] La actividad de un polipéptido ActRII o sus variantes también puede probarse en un ensayo a base de células o *in vivo*. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRII en la expresión de genes implicados en la producción de hueso en un osteoblasto o precursor. Esto, según sea necesario, puede realizarse en presencia de una o más proteínas de ligando ActRII recombinantes (por ejemplo BMP7), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido ActRII y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando ActRII. De igual manera, un polipéptido ActRII puede administrarse a un ratón u otro animal, y pueden evaluarse una o más propiedades de los huesos, tales como la densidad o el volumen. También puede evaluarse la velocidad de curación de fracturas óseas. De forma similar, la actividad de un polipéptido ActRII o sus variantes puede probarse en células de músculos, adipocitos y células neuronales para observar cualquier efecto en el crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los ensayos que se describen a continuación. Dichos ensayos se conocen bien y son rutinarios en la técnica.

[0054] Se pueden generar variantes obtenidas por combinación, que tienen una potencia selectiva relativa a un polipéptido ActRII de origen natural. Dichas proteínas de variantes, cuando se expresan de construcciones de ADN recombinante, se pueden usar en protocolos de terapia génica. De igual manera, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares dramáticamente diferentes a las que corresponden a un polipéptido ActRII de tipo natural. Por ejemplo, la proteína alterada puede convertirse ya sea a más estable o menos estable para la degradación proteolítica u otros procesos celulares que dan como resultado la destrucción o, de otra forma, la inactivación de un polipéptido ActRII nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden usarse para alterar los niveles de polipéptido ActRII modulando la semivida de los polipéptidos ActRII. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando es parte de un sistema de expresión inducible, puede controlar de manera más ajustada los niveles de polipéptido ActRII recombinante dentro de la célula.

[0055] En un caso preferido, la biblioteca de combinación se produce a modo de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que incluyen cada uno al menos una porción de secuencias de polipéptido ActRII potenciales. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente a secuencias génicas de tal forma que el conjunto degenerado de secuencias nucleotídicas de polipéptido ActRII potenciales puedan expresarse como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, por visualización de fagos).

[0056] Hay muchas maneras por la que la biblioteca de homólogos potenciales puede generarse a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de ADN, y después los genes sintéticos y se ligan a un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura y col., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier págs. 273-289; Itakura y col., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura y col., (1984) Science 198: 1056; Ike y col., (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott y col., (1990) Science 249: 386-390; Roberts y col., (1992) PNAS USA 89: 2429-2433; Devlin y col., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla y col., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las Patentes de Estados Unidos N° 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

[0057] Como alternativa, pueden utilizarse otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca de combinación. Por ejemplo, pueden generarse variantes de polipéptido ActRII (tanto de forma agonista como antagonista) y aislarse de una biblioteca mediante clasificación usando, por ejemplo, mutagénesis de clasificación de alanina y similares (Ruf y col., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang y col., (1994) J. Biol. Chem. 269: 3095-3099; Balint y col., (1993) Gene 137: 109-118; Grodberg y col., (1993) Eur. J. Biochem. 218: 597-601; Nagashima y col., (1993) J. Biol. Chem. 268: 2888-2892; Lowman y col., (1991) Biochemistry 30: 10832-10838; y Cunningham y col., (1989) Science 244: 1081-1085), mediante mutagénesis de barrido de enlazador (Gustin y col., (1993) Virology 193: 653-660; Brown y col., (1992) Mol. Cell Biol. 12: 2644-2652; McKnight y col., (1982) Science 232: 316); mediante mutagénesis por saturación (Meyers y col., (1986) Science 232: 613); mediante mutagénesis por PCR (Leung y col., (1989) Method Cell Mol Biol 1: 11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller y col., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener y col., (1994) Strategies in Mol Biol 7: 32-34). La mutagénesis mediante enlazador, particularmente en una configuración de combinación, es un procedimiento atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRII. En una realización específica, pueden usarse procedimientos similares para elaborar formas solubles de polipéptidos ActRII, que pueden actuar como agonistas o antagonistas de funciones ActRII.

[0058] Se conocen en la técnica una amplia diversidad de técnicas para clasificar productos génicos de bibliotecas de combinación hechas por mutaciones o truncamientos puntuales, y, de hecho, para clasificar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una determinada propiedad. Dichas técnicas se adaptarán generalmente para clasificar rápidamente las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis de combinación de los polipéptidos

ActR11. Las técnicas más ampliamente utilizadas para clasificar grandes bibliotecas génicas comprenden típicamente clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar las células con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes de combinación en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Cada uno de los ensayos ilustrativos que se describe a continuación son susceptibles de un análisis de alto rendimiento según sea necesario para clasificar grandes números de secuencias degeneradas creadas por técnicas de mutagénesis de combinación.

[0059] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActR11 de la presente invención incluyen peptidomiméticos. Como se usa en este documento, el término "peptidomimético" incluye péptidos modificados químicamente y moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos de origen sintético, peptoides, y similares. Los peptidomiméticos proporcionan diversas ventajas sobre un péptido, incluyendo una mejor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Se conocen bien en la técnica procedimientos para identificar un peptidomimético e incluyen la clasificación de bases de datos que contienen bibliotecas de peptidomiméticos potenciales. Por ejemplo, la base de datos estructural de Cambridge contiene una colección de más de 300.000 compuestos que tienen estructuras cristalinas conocidas (Allen y col., *Acta Crystallogr. Sección B*, 35: 2331 (1979)). Cuando no está disponible ninguna estructura cristalina de una molécula diana, puede generarse una estructura usando, por ejemplo, el programa CONCORD (Rusinko y col., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29: 251 (1989)). Otra base de datos, el Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.), contiene aproximadamente 100.000 compuestos que están disponibles en el mercado y también pueden buscarse para identificar peptidomiméticos potenciales de los polipéptidos ActR11.

[0060] Como ilustración, empleando mutagénesis de barrido para mapear los residuos aminoácidos de un polipéptido ActR11 que están implicados en la unión a otra proteína, pueden generarse compuestos peptidomiméticos que imitan los residuos implicados en la unión. Por ejemplo, pueden generarse análogos peptídicos no hidrolizables de dichos residuos usando una benzodiazepina (véase, por ejemplo, Freidinger y col., en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), azepina (véase, por ejemplo, Huffman y col., en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), anillos gamma lactama sustituidos (Garvey y col., en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), pseudopéptidos de cetometileno (Ewenson y col., (1986) *J. Med. Chem.* 29: 295; y Ewenson y col., en *Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)* Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), núcleos del dipéptido b-tum (Nagai y col., (1985) *Tetrahedron Lett* 26: 647; y Sato y col., (1986) *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 1231), y b-aminoalcoholes (Gordon y col., (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126: 419; y Dann y col., (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 134: 71).

[0061] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActR11 de la invención pueden comprender adicionalmente modificaciones postraslacionales además de cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos ActR11. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActR11 modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoácidos en la funcionalidad de un polipéptido ActR11 pueden ensayarse como se describe en este documento para otras variantes de polipéptido ActR11. Cuando se produce un polipéptido ActR11 en las células por escisión de una forma incipiente del polipéptido ActR11, el procesamiento postraslacional también puede ser importante para un plegado correcto y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraslacionales y pueden seleccionarse para asegurar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActR11.

[0062] En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActR11 incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una parte de los polipéptidos ActR11 y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero sin limitación, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa S (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humana. Puede seleccionarse un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía por afinidad. Para el propósito de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para la cromatografía por afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con compañeros de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActR11. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo GFP), así como "etiquetas de epítipo", que normalmente son secuencias de péptido cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipo bien conocidas para las que están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos, incluyen FLAG, hemaglutinina de virus de influenza (HA) y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el factor Xa o Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, de esta forma, libere las proteínas recombinantes de la misma. Después, las proteínas liberadas

posteriormente pueden aislarse del dominio de fusión mediante una separación por cromatografía posterior. En ciertas realizaciones preferidas, se fusiona un polipéptido ActRII con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRII *in vivo* (un dominio "estabilizante"). Por el término "estabilizante" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida en suero, sin importar si es debido a una destrucción disminuida, una eliminación disminuida a través del riñón, u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio intervalo de proteínas. De igual manera, las fusiones a albúmina de suero humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como una estimulación adicional del crecimiento muscular).

[0063] Como un ejemplo específico, la presente invención proporciona una proteína de fusión en forma de un antagonista GDF8 que comprende un dominio extracelular (por ejemplo unión a GDF8) fusionado a un dominio Fc (por ejemplo SEQ ID NO: 13).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVIIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

[0064] Preferiblemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, Lisina 322 y Asn-434 (véase la figura 12). En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo mutación Asp-265) tiene una capacidad de unión reducida al receptor Fc γ con respecto al dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo la mutación Asp-434) tiene una capacidad aumentada para la unión al receptor-Fc relacionado con MHC de clase I (FcRN) con respecto al dominio Fc de tipo natural.

[0065] Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden disponerse en cualquier forma que sea coherente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRII puede colocarse en C-terminal con respecto a un dominio heterólogo, o como alternativa, un dominio heterólogo puede colocarse en C-terminal con respecto a un polipéptido ActRII. El dominio de polipéptido ActRII y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y los dominios o secuencias aminoácidas adicionales pueden incluirse en C o N-terminal para cualquier dominio o entre los dominios.

[0066] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRII de la presente invención contienen una o más modificaciones que tienen la capacidad de estabilizar los polipéptidos ActRII. Por ejemplo, dichas modificaciones mejoran la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRII, mejoran la semivida en circulación de los polipéptidos ActRII o la degradación proteolítica reductora de los polipéptidos ActRII. Dichas modificaciones de estabilización incluyen, pero sin limitación, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRII y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRII), y modificaciones de un resto de carbohidratos (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidratos de un polipéptido ActRII). En el caso de proteínas de fusión, se fusiona un polipéptido ActRII a un dominio estabilizador, tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en este documento, la expresión "dominio estabilizante" no se refiere únicamente a un dominio de fusión (por ejemplo Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas, tales como un resto de carbohidrato, o polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol.

[0067] En ciertas realizaciones, la presente invención hace disponibles las formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRII, que están aisladas de, o de otro modo sustancialmente libres de, otras proteínas.

[0068] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRII (modificados o no modificados) de la invención se pueden producir a través de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos ActRII pueden sintetizarse usando técnicas de química de proteínas convencionales, tal como las descritas en Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman y Company, Nueva York (1992). Además, están disponibles en el mercado sintetizadores de péptidos automáticos (por ejemplo, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). Como alternativa, los polipéptidos, fragmentos o variantes de los mismos pueden producirse de forma recombinante usando diversos sistemas de expresión (por ejemplo *E. coli*, células de Ovario de Hamster Chino, células COS, baculovirus) como se conoce bien en la técnica (véase también más adelante). En una realización adicional, los polipéptidos ActRII modificados o no modificados pueden producirse mediante digestión de polipéptidos ActRII de longitud completa de origen natural o producidos de forma recombinante usando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima conversora de aminoácidos básicos emparejados (PACE). El análisis

informático (usando un software disponible en el mercado, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) se puede usar para identificar sitios de escisión proteolítica. Como alternativa, dichos polipéptidos ActRII pueden producirse a partir de polipéptidos ActRII de longitud completa de origen natural o producidos de forma recombinante, tal como mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tal como mediante escisión química (por ejemplo bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Polipéptidos ActRII que Codifican Ácidos Nucleicos

[0069] En ciertos aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRII solubles), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión desveladas en este documento. Por ejemplo, SEQ ID NOs: 7-8 codifican un polipéptido precursor ActRII de origen natural, mientras que SEQ ID NOs: 5-6 codifican polipéptidos ActRII solubles. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser de una sola hebra o de hebra doble. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para elaborar polipéptidos ActRII o en forma de agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

[0070] En ciertos aspectos, se entiende adicionalmente que los ácidos nucleicos en cuestión que codifican los polipéptidos ActRII, incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 7 u 8. Las secuencias nucleotídicas de variantes incluyen secuencias que difieren por una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas; y, por lo tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia codificante designada en SEQ ID NO: 7 u 8.

[0071] En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o el 100% idénticas a la SEQ ID NO: 5 ó 6. Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias para SEQ ID NO: 6, y las variantes de SEQ ID NO: 6, también están dentro del alcance de esta invención. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden aislarse, recombinarse y/o condensarse con una secuencia nucleotídica heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

[0072] En otros casos, los ácidos nucleicos de la divulgación también incluyen secuencias nucleotídicas que hibridan en condiciones altamente estrictas para la secuencia nucleotídica designada en SEQ ID NO: 5 ó 6, la secuencia de complemento de SEQ ID NO: 5 ó 6, o fragmentos de las mismas. Como se ha analizado anteriormente, un experto en la técnica comprenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación de ADN pueden variarse. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación de ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación en 6,0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C seguido de lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse entre una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C, hasta una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Se puede variar tanto la temperatura como la sal, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras que se cambian otras variables. En un caso, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado de 2 x SSC a temperatura ambiente.

[0073] Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos tal como se exponen en la SEQ ID NO: 6 debido a la degeneración en el código genético, también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, varios aminoácidos están diseñados mediante más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silentes" que no afectan a la secuencia aminoacídica de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que no conducen a cambios en la secuencias aminoacídicas de las proteínas en cuestión, existan entre células de mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular, pueden existir entre individuos de una especie determinada debido a una variación alélica natural. Cualesquiera y todas las variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes, están dentro del alcance de esta invención.

[0074] En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes de la presente invención pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias nucleotídicas reguladoras generalmente son adecuadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión adecuados y secuencias reguladoras adecuadas en la técnica para una diversidad de células huésped. Normalmente, dicha una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias líderes o señal, sitios de unión ribosomales, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias mejoradoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles conocidos en la técnica se contemplan por la invención. Los promotores pueden ser promotores que de origen natural o promotores

híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Puede estar presente una construcción de expresión en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

[0075] En ciertos aspectos de la invención, el ácido nucleico en cuestión se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido ActRII y unido de forma operativa a al menos a una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRII. Por consiguiente, la expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Se describen secuencias reguladoras ejemplares en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se enlaza de forma operativa a ésta, se pueden usar en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRII. Dicha secuencias de control y expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor tet, promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores RSV, el sistema tac y el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por polimerasa de ARN T7, las regiones mayores operadoras y promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa, u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa de ácido, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de correspondencia α de levadura, el promotor de polihedron del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debe apreciarse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se transformará y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se deben considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar el número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos.

[0076] Un ácido nucleico recombinante de la invención puede producirse ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procarióticas, células eucarióticas (levadura, aviar, insecto o mamífero) o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRII recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para expresión en células procarióticas, tales como *E. coli*.

[0077] Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en la bacteria, como una o más unidades de transcripción eucarióticas que se expresan en células eucarióticas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucarióticas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos en células tanto procarióticas como eucarióticas. Como alternativa, pueden usarse derivados de virus, tales como el virus de papiloma bovino (BPV-1), o virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión vírica (incluyendo retroviral) pueden encontrarse más adelante en la descripción de los sistemas de administración de terapia genética. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped se conocen en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados, tanto para células procarióticas como eucarióticas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Edición, de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes a través del uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tal como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tal como el pBlueBac III que contiene β -gal).

[0078] En una realización preferida, un vector se diseñará para la producción de los polipéptidos ActRII en cuestión en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCl-neo (Promega, Madison, Wise). Como será evidente, las construcciones génicas en cuestión pueden usarse para originar la expresión de los polipéptidos ActRII en cuestión en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas de variantes, para purificación.

[0079] Esta invención también pertenece a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 8) para uno o más de los polipéptidos ActRII en cuestión. La célula huésped puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polipéptido ActRII de la invención puede expresarse en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Se conocen otras células huésped adecuadas para los expertos en la técnica.

[0080] Por consiguiente, la presente invención pertenece adicionalmente a procedimientos para producir los polipéptidos ActRII en cuestión. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRII puede cultivarse en las condiciones adecuadas para permitir que tenga lugar la expresión del polipéptido ActRII. El polipéptido ActRII puede secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRII. Como alternativa, el polipéptido ActRII puede retenerse de forma citoplásmica o en una fracción de membrana, y las células se recolectaron, se lisaron y proteína se aisló. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Se conocen en la técnica medios adecuados para cultivo celular. Los polipéptidos ActRII en cuestión pueden aislarse de un medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por afinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRII. En una realización preferida, el polipéptido ActRII es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

[0081] En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia del sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el termino N de la parte deseada del polipéptido ActRII recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía por afinidad usando una resina de metal Ni²⁺. Después, la secuencia líder de purificación puede eliminarse posteriormente mediante tratamiento con una enterocinasa para proporcionar el polipéptido ActRII purificado (por ejemplo, véase Hochuli y col., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; y Janknecht y col., *PNAS USA* 88: 8972).

[0082] Se conocen bien técnicas para elaborar genes de fusión. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando términos de ligadura con extremo romo o un extremo escalonado, digestión de enzima de restricción para proporcionar términos adecuados, llenado de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no deseable, y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación PCR de los fragmentos de gen puede realizarse usando cebadores que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden hibridarse posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

4. Anticuerpos

[0083] Otro aspecto de la divulgación pertenece a los anticuerpos. Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRII (por ejemplo, un polipéptido ActRII soluble) y que se une de forma competitiva con el polipéptido ActRII puede usarse como un antagonista de las actividades del polipéptido ActRII. Por ejemplo, usando inmunógenos o derivados de un polipéptido ActRII, se pueden elaborar anticuerpos monoclonales o de anti-suero anti-proteína/anti-péptido mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo *Antibodies. A Laboratory Manual* ed. by Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o conejo pueden inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido ActRII, un fragmento antigénico que tiene la capacidad de provocar una respuesta del anticuerpo, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenecidad en una proteína o péptido incluyen conjugación a vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Una parte inmunogénica de un polipéptido ActRII puede administrarse en presencia de un adyuvante. El desarrollo de la inmunización puede supervisarse mediante la detección de los títulos de anticuerpo en plasma o en suero. Puede usarse ELISA convencional u otros inmunoensayos con el inmunógeno como un antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

[0084] Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRII, se puede obtener el anti-suero, y si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recolectar de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos de fusión de célula somática estándar con células de inmortalización, tales como células de mieloma para producir células de hibridoma. Dichas técnicas se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbar y col., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpo monoclonales humanos (Cole y col., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. págs. 77-96). Las células de hibridoma pueden clasificarse de forma inmunoquímica para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido ActRII y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

[0085] El término "anticuerpo", como se usa en este documento, pretende incluir fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con un polipéptido ActRII en cuestión. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos se clasifican para su uso de la misma forma que se ha descrito anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)₂ pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo de la presente divulgación pretende incluir adicionalmente moléculas

bioespecíficas, monocatenarias, quiméricas y humanizadas que tienen afinidad para un polipéptido ActRII conferido por al menos una región CDR del anticuerpo. En casos preferidos, el anticuerpo comprende adicionalmente una etiqueta unida al mismo y que tiene la capacidad de detectarse (por ejemplo, la etiqueta puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o co-factor enzimático).

5
 [0086] En ciertos casos preferidos, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo monoclonal, y en ciertos casos, la divulgación elabora procedimientos disponibles para generar anticuerpos novedosos. Por ejemplo, un procedimiento para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActRII puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido ActRII eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) del ratón y condensar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y ensayar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRII. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido ActRII. El anticuerpo monoclonal puede ser purificado del cultivo celular.

[0087] El adjetivo "específicamente reactivo con", como se usa en referencia a un anticuerpo, pretende significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es lo suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido ActRII) y otros antígenos que no son de interés ya que el anticuerpo es útil, como mínimo, para detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos procedimientos que emplean el anticuerpo, tal como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales tienen generalmente una mayor tendencia (en comparación con anticuerpos policlonales) a discriminar de forma eficaz entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influencia la especificidad de una interacción anticuerpo:antígeno es la afinidad de un anticuerpo para el antígeno. Aunque la efectividad deseada puede alcanzarse con un intervalo de afinidades diferentes, generalmente los anticuerpos preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menos.

[0088] Además, las técnicas usadas para clasificar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseado pueden influenciar las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se usa para la unión a un antígeno en solución, puede ser recomendable probar la unión de la solución. Una diversidad de diferentes técnicas están disponibles para probar la interacción entre anticuerpos y antígenos con el fin de identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmón (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suecia), ensayos de intercalado (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayo por inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

[0089] En ciertos aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen a un polipéptido ActRII soluble. Dichos anticuerpos pueden generarse tal como se ha descrito anteriormente, usando un polipéptido ActRII soluble o un fragmento del mismo como un antígeno. Los anticuerpos de este tipo pueden usarse, por ejemplo, para detectar polipéptidos ActRII en muestras biológicas y/o supervisar los niveles de polipéptido ActRII soluble en un individuo. En ciertos casos, puede usarse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido ActRII soluble para modular la actividad de un polipéptido ActRII y/o un ligando ActRII, regulando (promoviendo o inhibiendo) de esta forma el crecimiento de tejidos, tales como huesos, cartílago, músculo, grasa y neuronas.

5. Ensayos de Clasificación

[0090] En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere al uso de los polipéptidos ActRII en cuestión (por ejemplo, los polipéptidos ActRII solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos ActRII. Los compuestos identificados a través de esta clasificación pueden ensayarse en tejidos tales como hueso, cartílago, músculo, grasa y/o neuronas, para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos pueden ensayarse adicionalmente en modelos animales para evaluar su capacidad para modular crecimiento de tejido *in vivo*.

[0091] Existen numerosos enfoques para clasificar los agentes terapéuticos para modular el crecimiento de tejido dirigiendo los polipéptidos ActRII. En ciertos casos, la clasificación de alto rendimiento de los compuestos puede realizarse para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRII en el crecimiento de huesos, cartílagos, músculo, grasa y/o neuronas. En ciertos casos, el ensayo se realiza para clasificar e identificar compuestos que inhiben específicamente o reducen la unión de un polipéptido ActRII a su compañero de unión, tal como un ligando ActRII (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Como alternativa, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRII a su proteína de unión, tal como un ligando ActRII. En un caso adicional, los compuestos pueden identificarse por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRII.

[0092] Una diversidad de formatos de ensayo serán suficientes, y a la luz de la presente divulgación, los no

descritos de manera expresa en este documento, podrán considerarse por un experto en la técnica. Como se describe en este documento, los compuestos de prueba (agentes) de la divulgación se pueden crear mediante cualquier procedimiento químico de combinación. Como alternativa, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se ensayarán para comprobar su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento de tejido pueden producirse, por ejemplo, mediante bacterias, levaduras, plantas o otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producirse químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producirse de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados por la presente divulgación incluyen moléculas orgánicas de no peptídico, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En un caso específico, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular menor de aproximadamente 2.000 daltons.

[0093] Los compuestos de prueba de la divulgación pueden proporcionarse como entidades separadas, individuales o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tal como elaboradas mediante química de combinación. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser de aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de clasificación iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden derivarse opcionalmente con otros compuestos y tienen grupos de derivación que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos de derivación incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, fuentes magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticuladores fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

[0094] En muchos programas de clasificación de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento con el objeto de maximizar el número de compuestos estudiados en un período de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tal como derivados con proteínas purificadas o semi-purificadas, con frecuencia se prefieren como clasificaciones "primarias", ya que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, enfocándose el ensayo más bien principalmente en el efecto del fármaco en la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de afinidad de unión entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión (por ejemplo, un ligando ActRII).

[0095] Meramente como ilustración, en un ensayo de clasificación ejemplar de la presente divulgación, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRII aislado y purificado que tiene la capacidad ordinariamente de unirse a un ligando ActRII, según sea adecuado para la intención del ensayo. Después, a la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRII se le añade una composición que contiene un ligando ActRII. La detección y cuantificación de los complejos de ActRII/ligando ActRII proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejo entre el polipéptido ActRII y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una referencia para comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, el ligando ActRII aislado y purificado se añade a una composición que contiene el polipéptido ActRII, y la formación del complejo de ActRII/ligando ActRII se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en el que los reactivos pueden mezclarse puede variar, y pueden mezclarse de forma simultánea. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos celulares y lisados para hacer adecuado un sistema de ensayo libre de células.

[0096] La formación de complejos entre el polipéptido ActRII y su proteína de unión puede detectarse mediante una diversidad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas etiquetadas de forma detectable, tales como polipéptido ActRII radioetiquetado (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), etiquetado de forma fluorescente (por ejemplo, FITC) o etiquetado de forma enzimática o su proteína de unión, mediante inmunoensayo, o mediante detección cromatográfica.

[0097] En ciertos casos, la presente divulgación contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, ya sea directa o indirectamente, del grado de interacción entre el polipéptido ActRII y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de Estados Unidos Nº 5.677.196), resonancia de plasmón superficial (SPR), detectores de carga superficial y detectores de fuerza superficial, son compatibles con muchos casos de la divulgación.

[0098] Además, la presente divulgación contempla el uso de un ensayo trap de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos" para identificar agentes que interrumpen o potencian una interacción entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.283.317; Zervos y col. (1993) Cell 72: 223-232; Madura y col. (1993) J Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel y col. (1993) Biotechniques 14: 920-924; y Iwabuchi y col. (1993) Oncogene 8: 1693-1696). En un caso específico, la presente divulgación

contempla el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian interacciones entre el polipéptido ActRII 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 las Patentes de Estados Unidos N° 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

[0099] En ciertos casos, los compuestos en cuestión se identifican por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRII de la divulgación. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRII puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse en el nivel de la proteína usando procedimientos bioquímicos *in vitro*, incluyendo fotoreticulación, unión de ligando radioetiquetado y cromatografía por afinidad (Jakoby WB y col., 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden clasificarse en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRII. Este puede incluir un evento de unión de fase sólida o fase líquida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido ActRII puede transfectarse con un sistema informador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa, o proteína fluorescente verde) a una célula y clasificarse frente a la biblioteca preferiblemente mediante una clasificación de alto rendimiento o con elementos individuales de la biblioteca. Pueden usarse otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con la diana fijada a un pocillo, perla o trozo o capturarse por un anticuerpo inmovilizado, o resolverse mediante electroforesis capilar. Normalmente, los compuestos unidos pueden detectarse usando resonancia colorimétrica, de fluorescencia o de plasmón superficial.

[0100] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona polipéptidos de la invención para estimular muscular y aumentar la masa muscular, por ejemplo, antagonizando funciones de un ligando ActRII. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede probarse en células completas o tejidos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento muscular. Se pueden usar diversos procedimientos en la técnica para este fin. Por ejemplo, los procedimientos de la divulgación se realizan de tal forma que la transducción de señal a través de una proteína ActRII activada mediante unión a un ligando ActRII (por ejemplo, GDF8) se haya reducido o inhibido. Se reconocerá que el crecimiento de tejido muscular en el organismo puede dar como resultado un aumento de la masa muscular en el organismo en comparación con la masa muscular de un organismo correspondiente (o población de organismo) en el que no se ha efectuado la transducción de señal a través de una proteína ActRII.

[0101] Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRII o compuestos de prueba en el crecimiento y/o proliferación celular muscular pueden determinarse midiendo la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, que se asocian con la proliferación de células miogénicas, y la expresión génica de MyoD que está asociada con la diferenciación muscular (por ejemplo Amthor y col., *Dev Biol.* 2002, 251: 241-57). Se sabe que GDF8 desactiva de forma descendente la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, y evita la expresión génica de MyoD. Se espera que los polipéptidos ActRII o compuestos de prueba antagonicen esta actividad de GDF8. Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye medir la proliferación de mioblastos, tales como mioblastos C(2)C(12) en presencia de los polipéptidos ActRII o compuestos de prueba (por ejemplo, Thomas y col., *J Biol Chem.* 2000, 275: 40235-43).

[0102] La presente divulgación también contempla ensayos *in vivo* para medir la masa y fuerza muscular. Por ejemplo, Whittemore y col. (*Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 300: 965-71) desvelan un procedimiento para medir la masa musculoesquelética aumentada y el aumento de la fuerza de sujeción en ratones. Opcionalmente, este procedimiento se puede utilizar para determinar los efectos terapéuticos de los compuestos de prueba (por ejemplo, polipéptidos ActRII) en enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo aquellas enfermedades para las que es limitante la masa muscular.

[0103] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona polipéptidos de la invención para estimular la formación ósea y aumentar la masa ósea. Por consiguiente, se puede probar cualquier compuesto identificado en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modulación del crecimiento óseo y de cartílagos. Se pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para este fin.

[0104] Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRII o compuestos de prueba en el crecimiento de huesos o cartílagos puede determinarse midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos basados en células (véase, por ejemplo, Daluiski y col., *Nat Genet.* 2001, 27(1): 84-8; Hino y col., *Front Biosci.* 2004, 9: 1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye analizar la actividad osteogénica de los polipéptidos ActRII y los compuestos de prueba en cuestión en células progenitoras mesenquimales y osteoblásticas. Como ilustración, los adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido ActRII se construyeron para infectar células C3H10T1/2 progenitoras mesenquimales pluripotentes, células C2C12 pre-osteoblásticas y células TE-85 osteoblásticas. Después, la actividad osteogénica se determina midiendo la inducción de fosfatasa alcalina, osteocalcina y mineralización de matriz (véase, por ejemplo Cheng y col., *J bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8): 1544-52).

[0105] La presente divulgación también contempla ensayos *in vivo* para medir el crecimiento de huesos o cartílagos. Por ejemplo, Namkung-Matthai y col., *Bone*, 28: 80-86 (2001) desvelan un modelo osteoporótico en ratas en el que se estudia la reparación ósea durante el período temprano después de la fractura. Kubo y col., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68: 197-202 (1999) también desvelan un modelo osteoporótico de rata en el que

se estudia la reparación de huesos durante el período tardío después de una fractura. En ciertos aspectos, la presente divulgación aprovecha los ensayos de curación de fracturas que se conocen en la técnica. Estos ensayos incluyen técnicas de fracturas, análisis histológicos y análisis bioquímicos, que se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.521.750.

5
 [0106] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona polipéptidos de la invención para controlar la ganancia de peso y la obesidad. A nivel celular, la proliferación y diferenciación de adipocitos es importante en el desarrollo de la obesidad, lo que conduce a la generación de células de grasa adicionales (adipocitos). Por lo tanto, se puede probar cualquier compuesto identificado en células o tejidos complejos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular la adipogénesis midiendo la proliferación o diferenciación de adipocitos. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para este fin. Por ejemplo, el efecto de un polipéptido ActRII (por ejemplo, un polipéptido ActRII soluble) o compuestos de prueba en la adipogénesis puede determinarse midiendo la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros en ensayos basados en células, tal como, observando la acumulación de triacilglicerol en vesículas de tinción de Oil Red O y mediante la aparición de ciertos marcadores de adipocitos, tales como FABP (aP2/422) y PPAR γ 2. Véase, por ejemplo, Reusch y col., 2000, Mol Cell Biol. 20: 1008-20; Deng y col., 2000, Endocrinology. 141: 2370-6; Bell y col., 2000, Obes Res. 8: 249-54. Otro ejemplo de ensayos a base de células incluye analizar la función de los polipéptidos ActRII y los compuestos de prueba en la proliferación de adipocitos o células precursoras de adipocitos (por ejemplo células 3T3-L1), tal como, supervisando las células positivas a bromodesoxiuridina (BrdU). Véase, por ejemplo, Pico y col., 1998, Mol Cell Biochem. 189: 1-7; Masuno y col., 2003, Toxicol Sci. 75: 314-20.

[0107] Se entenderá que los ensayos de clasificación de la presente divulgación se aplican no sólo a los polipéptidos ActRII en cuestión y las variantes de los polipéptidos ActRII, sino también a cualquier compuesto de prueba incluyendo agonistas y antagonistas de los polipéptidos. Además, estos ensayos de clasificación son útiles para propósitos de verificación de diana de fármaco y control de calidad.

6. Usos Terapéuticos Ejemplares

[0108] En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o afección que está asociada con una actividad anormal de un polipéptido ActRII y/o un ligando ActRII (por ejemplo, GDF8). Estas enfermedades, trastornos o afecciones se denominan generalmente en este documento "afecciones asociadas a ActRII". En ciertos casos, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar o prevenir a un individuo que necesita de los mismos, a través de la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ActRII, como se ha descrito anteriormente. Estos procedimientos están dirigidos particularmente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más particularmente, seres humanos.

[0109] Como se usa en este documento, un producto terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con respecto a una muestra de control no tratada. El término "tratamiento", como se usa en este documento, incluye la profilaxis de la afección nombrada o la mejora o eliminación de la afección una vez se ha establecido.

[0110] Los complejos de ActRII/ligando ActRII, desempeñan funciones esenciales en crecimiento de tejido, así como procesos de desarrollo tempranos, tales como la formación correcta de diversas estructuras o en una o más capacidades post-desarrollo incluyendo el desarrollo sexual, la producción de hormona pituitaria y la creación de huesos y cartilagos. Por lo tanto, las afecciones asociadas a ActRII incluyen un crecimiento tisular anormal y defectos de desarrollo. Además, las afecciones asociadas a ActRII incluyen, pero sin limitación, trastornos del crecimiento y diferenciación celular, tales como inflamación, alergia, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y tumores.

[0111] Las condiciones asociadas a ActRII ejemplares incluyen trastornos neuromusculares (por ejemplo, distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, síndrome desgaste muscular, sarcopenia, caquexia, trastornos del tejido adiposo (por ejemplo obesidad), diabetes tipo 2 y enfermedad degenerativa ósea (por ejemplo osteoporosis). Otras afecciones asociadas a ActRII ejemplares incluyen trastornos musculodegenerativos y neuromusculares, reparación tisular (por ejemplo curación de heridas), enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica), trastornos inmunológicos (por ejemplo trastornos relacionados con una proliferación o función anormal de linfocitos), y obesidad o trastornos relacionados con la proliferación anormal de adipocitos.

[0112] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. La expresión "distrofia muscular" se refiere a un grupo de enfermedades músculo-degenerativas caracterizadas por el debilitamiento y deterioro gradual de los músculos esqueléticos y algunas veces los músculos del corazón y respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por un desgaste y debilidad muscular progresiva que comienza con cambios microscópicos en los músculos. Conforme los músculos

se degeneran con el tiempo, disminuye la fuerza muscular de la persona. Las distrofias musculares ejemplares que se pueden tratar con un régimen que incluye los polipéptidos ActRII en cuestión, incluyen: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), Distrofia Muscular de Limb-Girdle (LGMD), Distrofia Muscular Fasciocapulohumeral (FSH o FSHD) (también conocido como Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotónica (MMD) (también conocida como enfermedad de Steinert), Distrofia Muscular Oculofaríngea (OPMD), Distrofia Muscular Distal (DD), Distrofia Muscular Congénita (CMD).

[0113] La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) se describió por primera vez por el neurólogo Francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en los años de 1860. La Distrofia Muscular de Becker (BMD) se nombró después del doctor Alemán Peter Emil Becker, quien describió por primera vez esta variante de DMD en los años de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en varones, afectando a uno de 3.500 hombres. La DMD tiene lugar cuando el gen de la distrofina, localizado en el brazo corto del cromosoma X, se rompe. Ya que los hombres únicamente llevan una copia del cromosoma X, únicamente tienen una copia del gen de la distrofina. Sin la proteína de distrofina, el músculo se daña fácilmente durante los ciclos de contracción y relajación. Aunque en la etapa temprana en la enfermedad el músculo se compensa por regeneración, posteriormente en el músculo las células progenitoras ya no pueden mantenerse con el daño en curso y el músculo sano se reemplaza por tejido fibro-graso no funcional.

[0114] La BMD resulta de diferentes mutaciones en el gen de la distrofina. Los pacientes de BMD tienen cierta distrofina, aunque es insuficiente en cantidad o pobre en calidad. Habiendo algo de distrofina, se protege a los músculos de los que padecen BMD, de la degeneración de forma tan mala o tan rápida como los de personas con DMD.

[0115] Por ejemplo, investigaciones recientes demuestran que el bloqueo o eliminación de la función de GDF8 (un ligando ActRII) *in vivo*, puede tratar de forma eficaz al menos ciertos síntomas en pacientes con DMD y BMD (Bogdanovich y col., anteriormente; Wagner y col., anteriormente). Por lo tanto, los polipéptidos ActRII en cuestión pueden actuar como inhibidores GDF8 (antagonistas) y constituir un medio alternativo de bloqueo de las funciones de GDF8 y/o ActRII *in vivo* en pacientes con DMD y BMD.

[0116] De forma similar, los polipéptidos ActRII en cuestión proporcionan un medio eficaz para aumentar la masa muscular y otras afecciones de enfermedad que necesitan de crecimiento muscular. Por ejemplo, Gonzalez-Cadavid y col. (anteriormente) indicaron que la expresión se correlaciona de forma inversa con la masa libre de grasa en seres humanos y que el aumento de la expresión del gen GDF8 está asociado con la pérdida de peso en los hombres con síndrome de desgaste por SIDA. Mediante la inhibición de la función de GDF8 en pacientes con SIDA pueden aliviarse al menos ciertos síntomas del SIDA, si no se eliminan completamente, mejorando así significativamente la calidad de vida de los pacientes con SIDA.

[0117] Puesto que una pérdida de la función GDF8 (un ligando ActRII) también está asociada con pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes (Zimmers y col., anteriormente; McPherron y Lee, anteriormente), los polipéptidos ActRIIB en cuestión pueden usarse adicionalmente como un agente terapéutico para disminuir o prevenir el desarrollo de obesidad y diabetes tipo II.

[0118] El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer, se encuentra entre los aspectos más debilitantes y arriesgados para la vida del cáncer. La pérdida de peso progresiva en el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer, es una característica común de muchos tipos de cáncer y es responsable no sólo de una deficiente calidad de vida y una deficiente respuesta a la quimioterapia, sino también de un tiempo de supervivencia más corto que se encuentra en pacientes con tumores comparables sin pérdida de peso. Asociada con la anorexia, el desgaste de tejido graso y muscular, la ansiedad psicológica, y una menor calidad de vida, la caquexia surge de una interacción compleja entre el cáncer y el huésped. Es una de las causas más comunes de muerte entre pacientes con cáncer y está presente en el 80% de las muertes. Es un ejemplo complejo de caos metabólico que afecta al metabolismo de las proteínas, carbohidratos y grasas. Los tumores producen anomalías tanto directas como indirectas, que dan como resultado anorexia y pérdida de peso. Actualmente, no existe un tratamiento para controlar o invertir el proceso. El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer afecta a la producción de citocinas, la liberación de factores de movilización de lípidos e inducción de proteólisis, y las alteraciones en el metabolismo intermediario. Aunque la anorexia es común, una ingesta de alimentos disminuida sola no tiene la capacidad de abarcar los cambios en la composición corporal observados en pacientes con cáncer, y el aumento de la ingesta de nutrientes no tiene la capacidad de invertir el síndrome de desgaste. Debe sospecharse caquexia en pacientes con cáncer, si tiene lugar una pérdida de peso involuntaria mayor al cinco por ciento del peso premórbido en un periodo de seis meses.

[0119] Puesto que se descubrió que la sobreexpresión sistémica de GDF8 en ratones adultos induce una pérdida de músculo y grasa profunda análoga a la observada en síndromes de caquexia humanos (Zimmers y col., anteriormente), los polipéptidos ActRII en cuestión, como composiciones farmacéuticas pueden usarse de forma beneficiosa para evitar, tratar o aliviar los síntomas del síndrome de caquexia, cuando se desea el crecimiento muscular.

[0120] En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para inducir la formación de hueso

y/o cartílago, previniendo la pérdida de hueso, aumentando la mineralización de huesos o evitando la desmineralización de huesos. Por ejemplo, los polipéptidos ActRII en cuestión de la presente invención tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y la curación de las fracturas óseas y defectos en cartílagos en seres humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRII pueden ser útiles en pacientes que son diagnosticados con una

5 baja densidad ósea subclínica, como una medida protectora contra el desarrollo de la osteoporosis.

[0121] En una realización específica, las composiciones de la presente invención pueden encontrar utilidad médica en la curación de fracturas de huesos y defectos en cartílagos en seres humanos y otros animales. Los procedimientos y composiciones en cuestión también pueden tener un uso profiláctico en la reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas, y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de huesos de novo, inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por trauma o inducidos por resección oncológica, y también es útil en cirugía plástica cosmética. Además, pueden usarse las composiciones de la invención en el tratamiento de enfermedad periodontal, y en otros procesos de reparación dental. En ciertos casos, los polipéptidos ActRII en cuestión pueden proporcionar un ambiente para atraer a las células que forman huesos, estimular el crecimiento de células que forman huesos o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de huesos. Los polipéptidos ActRII de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de la osteoporosis. Además, los polipéptidos ActRII pueden usarse en la reparación de defectos de cartílagos y para prevenir/invertir la osteoartritis.

10
15

[0122] En otra realización específica, la presente invención proporciona una composición terapéutica para reparar fracturas y otras afecciones relacionadas a defectos en cartílagos y/o huesos o enfermedades periodontales. La divulgación proporciona adicionalmente procedimientos y composiciones terapéuticos para curar heridas y reparar tejidos. Los tipos de heridas incluyen, pero sin limitación, quemaduras, incisiones y úlceras. Véase, por ejemplo la Publicación PCT N° WO84/01106. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los polipéptidos ActRII de la invención en mezcla con vehículo, transportador o matriz farmacéuticamente aceptables.

20
25

[0123] En otra realización específica, las composiciones de la invención pueden emplearse en afecciones que originan la pérdida ósea, tales como osteoporosis hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, tirototoxicosis, estado de diarrea crónica o mala absorción, acidosis tubular renal, o anorexia nerviosa. Muchas personas saben que ser mujeres, tener un bajo peso corporal, y llevar un estilo de vida sedentario son factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea, que conduce a riesgo de fractura). Sin embargo, la osteoporosis también puede resultar del uso a largo plazo de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante de fármacos y otra afección médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una afección conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad en exceso de cortisol producido por el cuerpo da como resultado osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados a la osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida de forma natural por las glándulas suprarrenales. Aunque los niveles adecuados de hormonas de tiroides (que se producen por la glándula tiroidea) son necesarias para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormona tiroidea puede disminuir la masa ósea con el tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden conducir a la pérdida ósea cuando se toman en altas dosis por personas con problemas de riñón, particularmente las que se someten a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar la osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbituratos que se usan para prevenir las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un fármaco para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un fármaco utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y suprimir el sistema inmune en pacientes con trasplante de órganos; agonistas de liberación de la hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), usados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), usados para tratar el colesterol alto. La enfermedad de la goma origina la pérdida de hueso debido a que estas bacterias peligrosas en la boca obligan al cuerpo a defenderse contra ellas. Las bacterias producen toxinas de enzimas bajo la línea de goma, originando una infección crónica.

30
35
40
45
50

[0124] En casos adicionales, la presente divulgación proporciona procedimientos y agentes terapéuticos para tratar enfermedades o trastornos asociados con un crecimiento de huesos anormal o no deseado. Por ejemplo, pacientes que tienen la enfermedad conocida como Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP), desarrollan un "segundo esqueleto" anormal que evita cualquier movimiento. Adicionalmente, el crecimiento anormal de hueso puede ocurrir después de una cirugía de reemplazo de cadera y, por lo tanto, arruinar el resultado quirúrgico. Esto es un ejemplo más común de crecimiento de hueso patológico y una situación en la que los procedimientos y composiciones en cuestión pueden ser terapéuticamente útiles. Los mismos procedimientos y composiciones también pueden ser útiles para tratar otras formas de crecimiento anormal (por ejemplo, crecimiento patológico de huesos después de trauma, quemaduras o lesión en la médula espinal) y para tratar o prevenir las condiciones indeseables asociadas con el crecimiento de huesos anormal observado en relación con cáncer de próstata metastático u osteosarcoma. Los ejemplos de estos agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos ActRII que antagonizan la función de un ligando ActRII (por ejemplo BMP7), compuestos que interrumpen la interacción entre un ActRII y su ligando (por ejemplo, BMP7), y anticuerpos que se unen específicamente a un receptor ActRII de modo que un ligando ActRII (por ejemplo BMP7) no pueda unirse al receptor ActRII.

55
60
65

5 [0125] En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para regular el contenido de grasa corporal en un animal, y para tratar o prevenir afecciones relacionadas con el mismo, y particularmente, en afecciones que comprometen la salud, relacionadas con el mismo. De acuerdo con la presente invención, el hecho de regular (controlar) el peso corporal puede referirse a reducir o incrementar el peso corporal, reducir o aumentar la velocidad de ganancia de peso, o aumentar o reducir la velocidad de pérdida de peso, y también incluye mantener activamente, o no cambiar significativamente el peso corporal (por ejemplo, frente influencias externas o internas que de otra manera pueden aumentar o disminuir el peso corporal). Una realización de la presente invención se refiere a regular el peso corporal, administrando a un animal (por ejemplo, un ser humano) que necesita del mismo un polipéptido ActRII.

10 [0126] En una realización específica, la presente invención se refiere a polipéptidos para reducir el peso corporal y/o reducir la ganancia de peso en un animal, y más particularmente, para tratar o mejorar la obesidad en pacientes en riesgo de o que padecen de obesidad. En otro caso específico, la presente divulgación se dirige a procedimientos y compuestos para tratar a un animal que no tiene la capacidad de ganar o retener peso (por ejemplo, un animal con síndrome de desgaste). Dichos procedimientos son eficaces para aumentar el peso y/o la masa corporal, o para reducir el peso y/o la pérdida de masa, o para mejorar las afecciones asociadas con, u originadas por un peso y/o masa corporal indeseablemente bajo (por ejemplo no saludable).

15 [0127] En otras realizaciones, los polipéptidos ActRII en cuestión pueden usarse para formar composiciones farmacéuticas que pueden usarse de forma beneficiosa para prevenir, tratar o aliviar los síntomas de un huésped de enfermedades que implican neurodegeneración. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los polipéptidos ActRII en cuestión pueden antagonizar el mecanismo de retroalimentación inhibitorio mediado a través del receptor ALK7 de tipo I, permitiendo así un nuevo crecimiento y diferenciación neuronal. Los polipéptidos ActRII en cuestión como composiciones farmacéuticas pueden usarse para prevenir, tratar o aliviar los síntomas de enfermedades con neurodegeneración, incluyendo enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Huntington (EH).

20 [0128] La EA es un trastorno del sistema nervioso central (SNC) crónico, incurable e imparable que tiene lugar de forma gradual, dando como resultado pérdida de memoria, comportamiento inusual, cambios en la personalidad y una disminución de las capacidades cognitivas. Estas pérdidas están relacionadas con la muerte de tipos específicos de células cerebrales y la ruptura de conexiones entre ellas. La EA se ha descrito como un desarrollo de la infancia a la inversa. En la mayoría de la gente con EA, los síntomas aparecen después de la edad de 60. Los síntomas más tempranos incluyen pérdida de la memoria reciente, juicio defectuoso y cambios de la personalidad. Posteriormente en la enfermedad, aquellos con EA pueden olvidar cómo hacer tareas simples como lavarse las manos. Con el tiempo, las personas con EA pierden todas las capacidades de razonamiento y llegan a depender de otras personas para su cuidado diario. Finalmente, la enfermedad llega a ser tan debilitante que los pacientes quedan postrados en cama y típicamente desarrollan enfermedades coexistentes. Los pacientes con EA comúnmente mueren por neumonía, de 8 a 20 años desde la aparición de la enfermedad.

30 [0129] La EP es un trastorno del SNC crónico, incurable e imparable que tiene lugar de forma gradual y da como resultado movimientos corporales incontrolados, rigidez, temblores y dificultades para caminar. Estos problemas en el sistema del motor están relacionados con la muerte de células cerebrales en un área del cerebro que produce la dopamina, una sustancia química que ayuda a controlar la actividad muscular. En la mayor parte de la gente con EP, los síntomas aparecen después de los 50 años de edad. Los síntomas iniciales de la EP son un temblor pronunciado que afecta a las extremidades, notablemente en las manos o labios. Los síntomas característicos posteriores de la EP son rigidez o lentitud de movimiento, caminar arrastrando los pies, postura encorvada y equilibrio deteriorado. Hay un amplio intervalo de síntomas secundarios tales como pérdida de memoria, demencia, depresión, cambios emocionales, dificultades de deglución, discurso anormal, disfunción sexual y problemas de la vejiga y del intestino. Estos síntomas comenzarán a interferir con las actividades rutinarias, como sostener un tenedor o leer un periódico. Finalmente, personas con EP quedan tan profundamente incapacitadas que están postrados en cama. Las personas con EP generalmente mueren de neumonía.

40 [0130] La ELA, también denominada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de la neurona motora) es un trastorno del SNC crónico, incurable e imparable que ataca a las neuronas motoras, los componentes del SNC que conectan el cerebro a los músculos esqueléticos. En la ELA, las neuronas motoras se deterioran y con el tiempo mueren, y aunque el cerebro de las personas normalmente permanece completamente funcional y en alerta, la orden de moverse nunca llega a los músculos. La mayoría de las personas que tienen ELA tienen entre 40 y 70 años de edad. Las primeras de las neuronas motoras que se debilitan son las que dirigen los brazos o las piernas. Aquellos con ELA pueden tener problemas para caminar, pueden dejar caer las cosas, se caen, articulan mal al hablar y ríen o lloran descontroladamente. Con el tiempo, los músculos de las extremidades comienzan a atrofiarse de desuso. Esta debilidad muscular se convertirá en debilitante y una persona necesitará una silla de ruedas o será incapaz de manejarse fuera de la cama. La mayoría de los pacientes con ELA mueren de insuficiencia respiratoria o de complicaciones de la asistencia ventilatoria como neumonía, 3-5 años desde el inicio de la enfermedad.

55 [0131] Las causas de estas enfermedades neurológicas han permanecido en gran parte desconocidas. Convencionalmente se definen como enfermedades distintas, pero aún muestran claramente similitudes

extraordinarias en los procesos básicos y comúnmente demuestran síntomas solapantes mucho mayor de lo que pudiera esperarse sólo por azar. Las definiciones de las enfermedades actuales no tratan adecuadamente el problema de la superposición y se ha reclamado una nueva clasificación de los trastornos neurodegenerativos.

5 **[0132]** La EH es otra enfermedad neurodegenerativa resultante de la degeneración genéticamente programada de neuronas en ciertas áreas del cerebro. Esta degeneración causa movimientos incontrolados, pérdida de las facultades intelectuales y trastornos emocionales. La EH es una enfermedad familiar, se transmite de padres a hijos a través de una mutación dominante en el gen de tipo natural. Algunos síntomas tempranos de la EH son cambios de humor, depresión, irritabilidad o problemas en la conducción, al aprender cosas nuevas, al recordar un hecho o al
10 tomar una decisión. Según la enfermedad avanza, la concentración en tareas intelectuales se hace cada vez más difícil y el paciente puede tener dificultad para alimentarse y en la deglución. La tasa de progresión de la enfermedad y la edad de inicio varían de persona a persona.

15 **[0133]** La enfermedad de Tay-Sachs y la enfermedad de Sandhoff son enfermedades por el almacenamiento de glucolípidos causadas por la falta de p-hexosaminidasa lisosomal (Gravel y col., in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Scriver y col., McGraw-Hill, Nueva York, págs. 2839-2879, 1995). En ambos trastornos, la gangliosida GM2 y los sustratos glucolipídicos relacionados para p-hexosaminidasa se acumulan en el sistema nervioso y desencadenan una neurodegeneración aguda. En las formas más graves, el inicio de los síntomas comienza en la infancia temprana. Entonces sobreviene una etapa neurodegenerativa estrepitosa, mostrando los niños afectados disfunción motora, convulsiones, pérdida visual y sordera. La muerte ocurre generalmente a los 2-5 años de edad. Se ha demostrado la pérdida neuronal a través de un mecanismo de apoptosis (Huang y col., *Hum. Mol. Genet.* 6: 1879-1885, 1997).

25 **[0134]** Es bien sabido que la apoptosis tiene una función en la patogénesis del SIDA en el sistema inmunológico. Sin embargo, el VIH-1 también induce enfermedad neurológica. Shi y col. (*J. Clin. Invest.* 98: 1979-1990, 1996) examinaron la apoptosis inducida por la infección por el VIH de los sistema de nervioso central (SNC) en un modelo *in vitro* y en el tejido cerebral de pacientes con SIDA, y descubrieron que la infección por VIH-1 de cultivos cerebrales primarios inducía apoptosis en neuronas y astrocitos *in vitro*. La apoptosis de neuronas y astrocitos también se detectó en el tejido cerebral de 10/11 pacientes con SIDA, incluyendo 5/5 pacientes con demencia por
30 VIH-1 y 4/5 pacientes sin demencia.

[0135] La pérdida neuronal es también una característica saliente de enfermedades priónicas, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos, la EEB en el ganado bovino (enfermedad de las vacas locas),
35 enfermedad de Scrapie en ovejas y cabras y encefalopatía espongiiforme felina (EEF) en gatos.

[0136] Los polipéptidos ActRII en cuestión son también útiles para prevenir, tratar y aliviar los síntomas de diversos trastornos del SNP, tales como los descritos a continuación. El SNP está compuesto por los nervios que conducen a o se ramifican desde el SNC. Los nervios periféricos manejan una gran variedad de funciones en el cuerpo, incluyendo las funciones sensoriales, motoras y autonómicas. Cuando un individuo tiene una neuropatía periférica,
40 se han dañado los nervios del SNP. El daño al nervio puede surgir de una serie de causas, tales como enfermedad, lesiones físicas, envenenamiento o desnutrición. Estos agentes pueden afectar a los nervios aferentes o eferentes. Dependiendo de la causa del daño, el axón de la célula del nervio, su vaina protectora de la mielina, o ambos pueden lesionarse o destruirse.

45 **[0137]** La expresión "neuropatía periférica" incluye una amplia diversidad de trastornos en los que los nervios fuera del cerebro y los nervios periféricos de la médula espinal se han dañado. La neuropatía periférica también puede referirse a neuritis periférica, o si están involucrados muchos nervios, pueden utilizarse los términos polineuropatía o polineuritis.

50 **[0138]** La neuropatía periférica es un desorden generalizado, y hay muchas causas subyacentes. Algunas de estas causas son comunes, como la diabetes, y otras son extremadamente raras, como el envenenamiento con acrilamida y ciertos trastornos hereditarios. La causa más común en todo el mundo de la neuropatía periférica es la lepra. La lepra es causada por la bacteria *Mycobacterium leprae*, que ataca los nervios periféricos de las personas afectadas. Según las estadísticas recogidas por la Organización Mundial de la Salud, 1,15 millones de personas
55 estimadas en todo el mundo tienen lepra.

[0139] La lepra es extremadamente rara en los Estados Unidos, donde la diabetes es la causa más comúnmente conocida de la neuropatía periférica. Se ha estimado que más de 17 millones de personas en los Estados Unidos y Europa tienen polineuropatía relacionadas con la diabetes. Muchas neuropatías son idiopáticas, no puede encontrarse una causa conocida. La más común de las neuropatías periféricas hereditarias en los Estados Unidos es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, que afecta a aproximadamente 125.000 personas.
60

[0140] Otra de las neuropatías periféricas más conocidas es el síndrome de Guillain-Barre, que surge de las complicaciones asociadas con enfermedades virales, como citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), o una infección bacteriana, incluyendo *Campylobacter jejuni* y enfermedad de Lyme. La tasa de incidencia en todo el mundo es aproximadamente 1,7 casos por cada 100.000 personas
65

anualmente. Otras causas conocidas de neuropatías periféricas incluyen el alcoholismo crónico, infección del virus de la varicela zoster, botulismo y poliomielitis. La neuropatía periférica puede desarrollarse como un síntoma primario, o puede deberse a otra enfermedad. Por ejemplo, la neuropatía periférica es únicamente un síntoma de enfermedades tales como la neuropatía amiloide, ciertos tipos de cáncer, o trastornos neurológicos hereditarios. Dichas enfermedades pueden afectar al sistema nervioso periférico (SNP) y el sistema nervioso central (SNC), así como a otros tejidos del cuerpo.

[0141] Otras enfermedades del SNP tratables con los polipéptidos ActRII en cuestión incluyen: Neuropatías del plexo braquial (enfermedades de las cervicales y primeras raíces torácicas, troncos del nervio, cordones y componentes periféricos del nervio del plexo braquial. Las manifestaciones clínicas incluyen dolor regional, parestesia; debilidad muscular y disminución de la sensibilidad en la extremidad superior. Estos trastornos pueden estar asociados con un trauma, incluyendo lesiones del nacimiento; síndrome de salida torácica; neoplasias, neuritis, radioterapia; y otras afecciones. Véase, Adams y col., *Principles of Neurology*, 6ª ed., págs. 1351-2); Neuropatías Diabéticas (trastornos del nervio periféricos, autonómicos y craneales que están asociados con la diabetes mellitus). Estas afecciones suelen resultar de una lesión microvascular diabética que involucra los vasos sanguíneos pequeños que irrigan los nervios (vasa nervorum). La afecciones relativamente comunes que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen parálisis del tercer nervio; mononeuropatía; mononeuropatía múltiple; amiotrofia diabética; una polineuropatía dolorosa; neuropatía autonómica; y neuropatía toracoabdominal (véase Adams y col., *Principles of Neurology*, 6ª ed., pág. 1325); mononeuropatías (enfermedad o trauma que involucra a un solo nervio periférico en el aislamiento, o fuera de proporción con evidencia de disfunción del nervio periférico difuso). La mononeuropatía múltiple se refiere a una afección caracterizada por múltiples lesiones nerviosas aisladas. La mononeuropatías pueden resultar de una variedad de causas, incluyendo isquemia; lesión traumática; compresión; enfermedades del tejido conectivo; trastornos traumáticos acumulativos; y otras afecciones); Neuralgia (dolor intenso o dolor punzante que ocurre a lo largo del recorrido o la distribución de un nervio periférico o craneal); Neoplasias del sistema nervioso periférico (neoplasias que se presentan en el tejido nervioso periférico. Esto incluye neurofibromas; Schwannomas; tumores de células granulares; y tumores de la vaina del nervio periférico malignos. Véase, DeVita Jr y col., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5ª ed., págs. 1750-1); Síndromes de compresión nerviosa (compresión mecánica de los nervios o raíces nerviosas por causas internas o externas. Pueden producirse en un bloque de la conducción de los impulsos nerviosos, debido, por ejemplo, a la disfunción de la vaina de mielina, o la pérdida axonal. Las lesiones del nervio y de la vaina del nervio pueden causarse por isquemia; inflamación; un efecto mecánico directo; o Neuritis (un término general que indica la inflamación de un nervio craneal o periférico). La manifestación clínica puede incluir dolor; parestesias; paresia; o hipertesia; Polineuropatías (enfermedades de los nervios periféricos múltiples). Las diversas formas se clasifican por el tipo de nervio afectado (por ejemplo, sensorial, motor o autonómico), por la distribución de la lesión del nervio (por ejemplo, distal frente a proximal), por el componente del nervio afectado principalmente (por ejemplo, desmielinizante frente a axonal), por etiología, o por el patrón de herencia.

7. Composiciones farmacéuticas

[0142] En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRII de la presente invención se formulan con un transportador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRII puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden formularse para su administración en cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

[0143] En ciertos casos, el procedimiento terapéutico de la divulgación incluye administrar la composición por vía tópica, sistémica o local en forma de un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención, por supuesto, es una forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Adicionalmente, la composición puede encapsularse o inyectarse de forma deseada en una forma viscosa para la administración a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo, un sitio que tiene un daño tisular. La administración tópica puede ser adecuada para curar heridas y reparar tejidos. Agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos ActRII, que también pueden incluirse opcionalmente en la composición como se ha descrito anteriormente, pueden, como alternativa o adicionalmente, administrarse de forma simultánea o secuencial con los compuestos en cuestión (por ejemplo polipéptidos ActRII) en los procedimientos de la divulgación.

[0144] En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz con la capacidad de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRII) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), proporcionar una estructura para el desarrollo tisular y la capacidad óptima de ser reabsorbida en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRII. Dichas matrices pueden formarse de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

[0145] La elección del material de matriz se basa en propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirán la formulación adecuada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato cálcico biodegradable y químicamente definido, tricalciofosfato, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos.

Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tal como colágeno óseo o dérmico. Las matrices adicionales pueden estar constituidas por proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tal como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar comprendidas de combinaciones de cualesquiera de los tipos de material que se han mencionado anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita, o colágeno y tricalciofosfato. Las biocerámicas pueden alterarse en su composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato y procesarse para alterar el tamaño del poro, tamaño de partícula, forma de la partícula y la biodegradabilidad.

5
10 **[0146]** En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo en forma de cápsulas, sobres, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base con sabor, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia), y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente en forma de un ingrediente activo. Un agente también se puede administrar en forma de un bolo, compresa o pasta.

15
20 **[0147]** En formas de dosificación sólidas para administración oral (por ejemplo cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares) se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolina y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato cálcico, estearato magnésico, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina de relleno blando o duro usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

25
30
35 **[0148]** Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados 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, semilla de algodón, nuez, maíz, germen, oliva, ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso 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, agentes edulcorantes, saporíferos, colorantes, perfumantes y conservantes.

40
45 **[0149]** Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

50 **[0150]** Ciertas composiciones desveladas en este documento se pueden administrar por vía tópica, ya sea a la piel o a las membranas mucosas. Las formulaciones tópicas pueden incluir adicionalmente una o más de una amplia variedad de agentes que se sabe que son eficaces conocidos como potenciadores de la penetración en la piel o estratocórneos. Los ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, sulfóxido de dimetilo y azona. Los agentes adicionales pueden incluirse adicionalmente para hacer la formulación cosméticamente aceptable. Los ejemplos de éstos son grasas, ceras, aceites, tintas, fragancias, agentes conservantes, estabilizantes y de superficie activa. También pueden incluirse agentes queratolíticos, tales como los conocidos en la técnica. Los ejemplos son ácido salicílico y azufre.

55
60 **[0151]** Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un transportador farmacéuticamente aceptable y con cualesquier conservante, tamponante o propulsor que pueda requerirse. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del compuesto en cuestión de la invención (por ejemplo, un polipéptido ActRII), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

65 **[0152]** Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de un compuesto en cuestión, excipientes tales

como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente los propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles sin sustituir, tales como butano y propano.

5 **[0153]** En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRII en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que convierten a la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de transportadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, etanol, polioles (tal 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. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, a través del uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y a través del uso de tensioactivos.

10 **[0154]** Las composiciones de la presente invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéuticamente inyectable puede proporcionarse a través de la inclusión de agentes, que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

15 **[0155]** Se entenderá que el régimen de dosificación se determinará por el especialista en cuestión, considerando diversos factores que modifiquen la acción de los polipéptidos en cuestión de la invención. Los diversos factores incluyen, pero sin limitación, la cantidad de peso óseo deseado que se formará, el sitio de lesión del hueso, la afección del hueso dañado, el tamaño de una herida, el tipo de tejido dañado, la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosificación. El progreso puede supervisarse mediante evaluación periódica del crecimiento y/o reparación del hueso, por ejemplo, mediante rayos X, determinaciones histomórfométricas y etiquetado de tetraciclina.

20 **[0156]** En ciertos casos de la divulgación, pueden administrarse uno o más polipéptidos ActRII, juntos (en forma simultánea) o en diferentes momentos (secuencialmente o solapante). Además, los polipéptidos ActRII pueden administrarse con otro tipo de agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente inductor del cartílago, un agente inductor de los huesos, un agente inductor de los músculos, un agente reductor de la grasa o un agente inductor de las neuronas. Los dos tipos de compuestos se pueden administrar de forma simultánea o en diferentes momentos. Se espera que los polipéptidos ActRII de la invención puedan actuar junto con o posiblemente, de forma sinérgica con otro agente terapéutico.

25 **[0157]** En un ejemplo específico, se han descrito una diversidad de factores osteogénicos, que inducen cartílagos y que inducen huesos, particularmente bisfosfonatos. Véase, por ejemplo las Solicitudes de Patente Europeas N° 148.155 y 169.016. Por ejemplo, otros factores que pueden combinarse con los polipéptidos ActRII en cuestión incluyen diversos factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β) y factor de crecimiento insulínico (IGF).

30 **[0158]** En ciertos casos, la presente divulgación también proporciona terapia genética para la producción *in vivo* de polipéptidos ActRII. Dicha terapia puede lograr su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótido ActRII en células y tejidos que tienen los trastornos que se han descrito anteriormente. La administración de las secuencias de polinucleótido ActRII puede lograrse 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 polinucleótido ActRII el uso de liposomas dirigidos.

35 **[0159]** Los diversos vectores víricos que se pueden usar para terapia génica, como se muestra en este documento, incluyen adenovirus, herpes virus, vacunas o preferiblemente un virus de ARN, tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un solo gen extraño incluyen, pero sin limitación: virus de leucemia de murino Moloney (MoMuLV), virus de sarcoma de murino Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario de murino (MuMTV), y Virus de Sarcoma de Rous (RSV). Varios 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 puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. La dirección preferida se realiza usando un

anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias polinucleotídicas específicas pueden insertarse en el genoma retroviral o adherirse a una envoltura viral para permitir la administración específica diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRII. En una realización preferida, el vector se dirige a células/tejidos de huesos, cartílagos, músculos o neuronas.

[0160] Como alternativa, las células de cultivo de tejidos pueden transfectarse directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección de fosfato cálcico convencional. Después, estas células se transfectan con el plásmido de vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

[0161] Otro sistema de administración dirigido para polinucleótidos ActRII es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, perlas, un sistema a base de lípidos que incluye emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta divulgación es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. El ARN, ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y pueden administrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, y col., Trends Biochem. Sci., 6: 77, 1981). Se conocen en la técnica procedimientos para transferir genes de forma eficaz usando un vehículo de liposoma, véase, por ejemplo, Mannino, y col., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma normalmente es 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 resistencia iónica y la presencia de cationes divalentes.

[0162] Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tal como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidas y gangliosidas. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. La dirección de los liposomas también es posible en base, por ejemplo, a la especificidad del órgano, especificidad de las células y la especificidad del organelo y se conoce en la técnica.

EJEMPLIFICACIÓN

[0163] La invención se describirá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1. Generación de mutantes ActRIIB:

[0164] Los Solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre ActRIIB extracelular y un dominio Fc. Una estructura co-cristalina de Activina y ActRIIB extracelular no mostró ninguna función para los 15 aminoácidos finales (C-terminal) (denominados como la "cola" en este documento) del dominio extracelular en la unión a ligando. Esta secuencia no pudo resolver la estructura cristalina, sugiriendo que estos residuos están presentes en un bucle flexible que no se empaquetó de forma uniforme en el cristal. Thompson y col. EMBO J. 1 de abril de 2003; 22(7): 1555-66. Esta secuencia también está débilmente conservada entre ActRIIB y ActRIIA. Por consiguiente, estos residuos se omitieron en la construcción de la fusión ActRIIB-Fc básica, o antecedente. Adicionalmente, la posición 64 en la forma antecedente está ocupada por una alanina, que se considera generalmente la forma "de tipo natural", aunque un alelo A64R aparece de forma natural. Por lo tanto, la fusión ActRIIB-Fc antecedente tiene la secuencia (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 14):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLRCEGEQDKRLHCYASWANSSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHCPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEK TISKAKGQP
REPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

[0165] De forma sorprendente, como se analiza a continuación, se descubrió que la cola C-terminal mejoraba la unión a activina y GDF-11, así, una versión preferida de ActRIIB-Fc tiene una secuencia (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO:15):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP
TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEV

KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

5 **[0166]** Se introdujeron diversas mutaciones en la proteína ActRIIB-Fc antecedente. Se generaron mutaciones en el dominio extracelular ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Después del análisis por PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, se digirieron con Sfol y Agel y se purificaron con. Estos fragmentos se ligaron en un vector de expresión pAID4 de modo que tras la ligadura, se creó la quimera de fusión con IgG1 humano. Tras la transformación en E. coli DH5 alfa, las colonias se recolectaron y se aislaron los ADN. Todos los mutantes se verificaron por secuencia.
10

[0167] Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección temporal. En resumen, en una rueda giratoria de 500 ml, se ajustaron células HEK293T en 6×10^5 células/ml en un medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250 ml y crecieron durante una noche. Al siguiente día, estas células se trataron con complejo de ADN:PEI (1:1) a una concentración final de ADN de 0,5 ug/ml. Después de 4 horas, se añadieron 250 ml de medio y las células crecieron durante 7 días. El medio acondicionado se recolectó mediante giros de las células y se concentró.
15

[0168] Todos los mutantes se purificaron sobre una columna de proteína A y se eluyeron con tampón de glicina de pH bajo (3,0). Después de la neutralización, se dializaron frente a PBS.
20

[0169] Los mutantes también se produjeron en células CHO mediante metodología similar.

[0170] Los mutantes se ensayaron en ensayos y/o bioensayos de unión que se describen a continuación. Las proteínas expresadas en células CHO y células HEK293 eran indistinguibles en los ensayos y bioensayos de unión.
25

Ejemplo 2. Unión de GDF-11 y Activina A

[0171] La unión de proteínas ActRIIB-Fc se ensayó en un ensayo BiaCore™.
30

[0172] Se inmovilizaron GDF-11 o Activina A ("ActA") en un chip BiaCore CM5 usando un procedimiento de acoplamiento amina convencional. El mutante ActRIIB-Fc o la proteína de tipo natural se cargó en el sistema, y la unión se midió. Los resultados se resumen en la Tabla 1 que se muestra a continuación.

[0173]

Tabla 1: Unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF11 y Activina A (ensayo BiaCore).

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD = 1,8e-7M (+)	KD = 2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD = 8,6e-8M (+++)
+ 15cola	KD ~2,6 e-8M (+++)	KD = 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD = 4,35e-9 M +++++	KD = 5,3e-9M +++++
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
ActRIIB	ActA	GDF11
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	-
F82A	++	-

* No se observó unión
 -- unión <1/5 WT
 - unión ~1/2 WT
 + WT
 ++ unión aumentada <2x
 +++ unión aumentada ~5x
 ++++ unión aumentada ~10x
 ++++ unión aumentada ~ 40x

5 [0174] Como se muestra en la Tabla 1, las mutaciones tenían efectos variables en la unión a ligando. La adición de los 15 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular provocó un aumento sustancial en la afinidad de unión tanto para Activina A como para GDF-11, y se espera que este efecto se traslade a básicamente todas las demás mutaciones. Otras mutaciones provocaron un aumento general en la afinidad de unión a ligando, incluyendo el alelo A64R y K74A de origen natural. La mutación R40A provocó un descenso moderado en la afinidad de unión tanto para Activina A como para GDF-11. Muchas mutaciones suprimieron la unión detectable a Activina A y GDF-11, incluyendo: E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Ciertas mutaciones provocaron un desplazamiento en la selectividad. Las siguientes mutaciones provocaron un aumento en la proporción de GDF-11 para la unión a Activina A: K74Y, K74F, K74I y D80I. Las siguientes mutaciones provocaron un descenso en la proporción de GDF-11 para la unión a Activina A: D54A, K55A, L79A y F82A.

15 Ejemplo 3. Bioensayo de señalización mediada por GDF-11 y Activina

[0175] Se usó un ensayo de Gen Informador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc en la señalización mediante GDF-11 y Activina A. Línea celular: Rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector informador: pGL3(CAGA)12 (Descrito en Dennler y col., 1998, EMBO 17: 3091-3100). Véase la figura 5. El motivo

CAGA12 está presente en genes que responden a TGF-Beta (gen PAI-1), de modo que este vector es de uso general para factores de señalización a través de Smad2 y 3.

[0176] Día 1: División de células A-204 en placa de 48 pocillos.

[0177] Día 2: Células A-204 transfectadas con 10 ug de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAG A)12 (10 ug) + pRLCMV (1 ug) y Fugene.

[0178] Día 3: Añadir factores (diluidos en un medio + BSA al 0,1%). Los inhibidores necesitan incubarse previamente con Factores durante 1 hora antes de añadirse a las células. 6 horas después, las células se aclaran con PBS y se lisan las células.

[0179] Esto está seguido de un ensayo de luciferasa. En la ausencia de cualesquier inhibidor, la Activina A mostró una estimulación de 10 veces más de la expresión del gen informador y un ED50 ~2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces mayor, ED50: ~1,5 ng/ml.

[0180] Como se muestra en la figura 16, ActRIIB-Fc de tipo natural (A64 antecedente) inhibe la señalización de GDF-11 en el Ensayo del Gen Informador A-204. La construcción A64 antecedente mostró un efecto inhibitor sobre la actividad de GDF-11. La mutación A64K (también una forma de origen natural) provocó un aumento sustancial en la inhibición de GDF-11, y una combinación de la mutación A64K con la adición de los 15 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular (la "cola" de 15 aminoácidos) produjo un inhibidor incluso más potente de la actividad de GDF-11. Como se muestra en la figura 17, la construcción A64 antecedente mostró un efecto inhibitor sobre la actividad de la Activina A. La mutación K74A provocó un aumento sustancial en la inhibición de la Activina A. Una muestra de control que carecía de Activina A no mostró ninguna actividad.

[0181] Estos datos del sistema de bioensayo se correlacionan bien con los ensayos de unión mostrados en la Tabla 1 y demuestran que los efectos de las diversas mutaciones se trasladan a un sistema biológico.

Ejemplo 4: Proteínas de Fusión ActRIIA-Fc

[0182] Como se muestra en la figura 14, ActRIIA y ActRIIB están altamente conservados. Por consiguiente, se espera que la mayor parte de las mutaciones ensayadas en ActRIIB tengan efectos similares en ActRIIA. Por lo tanto, una fusión ActRIIA-Fc antecedente puede construirse con la siguiente secuencia (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 16):

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQ
GCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

[0183] Como se analiza a continuación, se descubrió que la cola C-terminal mejoraba la unión a activina y GDF-11, por lo tanto, una versión preferida de ActRIIA-Fc tiene una secuencia (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 17):

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQ
GCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMVETQPTSNPVT
KPPGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGO
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSL
LSPGK

[0184] Pueden hacerse mutaciones adicionales, que corresponden a las hechas en ActRIIB, en la versión antecedente de ActRIIA o la versión "cola" de ActRIIA. La correspondencia entre las mutaciones ActRIIB y ActRIIA

ES 2 426 005 T3

se muestra en la Tabla 2 que se indica a continuación.

Mutante ActRIIB	Efecto Funcional	Mutante ActRIIA Correspondiente
WT (64A)	Antecedente	WT es K65, por lo que se espera que la mutación K65A disminuya la unión a todos los ligandos.
WT (64R)	Aumento de la unión a todos los ligandos.	K65, antecedente.
+ 15cola	Aumento de la unión a todos los ligandos.	+15 cola
E37A	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	E38A
R40A	Disminución de la unión a todos los ligandos	R41A
D54A	Disminución de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	D55A
K55A	Disminución de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	K56A
R56A	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	R57A
K74A	Aumento de la unión a todos los ligandos.	K75A
K74Y	Aumento de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	K75Y
K74F	Aumento de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	K75F
K74I	Aumento de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	K75I
W78A	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	W79A
L79A	Disminución de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	L80A
D80K	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81K
D80R	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81R
D80A	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81A
D80F	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81F
D80G	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81G
D80M	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81M
D80N	Eliminación de la unión detectable a todos los ligandos.	D81N
D80I	Aumento de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	D81I
F82A	Disminución de la proporción de unión a GDF-11/Activina.	I83A

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido ActRIIB soluble que comprende un dominio extracelular de un polipéptido ActRIIB que tiene una secuencia aminoacídica al menos al 97% idéntica a la SEQ ID NO: 2, un enlazador flexible que tiene la secuencia TGGG, y un dominio Fc de inmunoglobulina, en el que el dominio Fc de inmunoglobulina está condensado al extremo C del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB mediante el enlazador flexible, y en el que el polipéptido ActRIIB comprende un dominio de unión a GDF8 alterado que incluye una o más mutaciones que aumentan la selectividad del dominio de unión para
- 5
- 10 (a) GDF8 sobre activina con respecto al dominio de unión a GDF8 de SEQ ID NO: 2,
- (b) activina sobre GDF8 con respecto al dominio de unión a GDF8 de SEQ ID NO: 2, o
- 15 (c) GDF8 y activina con respecto al dominio de unión a GDF8 de SEQ ID NO: 2.
2. El polipéptido ActRIIB soluble de la reivindicación 1, en el que la secuencia aminoacídica del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB es al menos al 98% idéntico a SEQ ID NO: 2.
3. El polipéptido ActRIIB soluble de la reivindicación 1, en el que la secuencia aminoacídica del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB es al menos al 99% idéntico a SEQ ID NO: 2.
- 20
4. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio Fc de inmunoglobulina comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 13.
- 25
5. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el residuo aminoacídico Asp en la posición 62 de la SEQ ID NO: 2 muta a un residuo aminoacídico seleccionado entre el grupo que consiste en: un aminoácido no cargado, un aminoácido negativo y un aminoácido hidrófobo.
- 30
6. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido ActRIIB soluble incluye uno o más residuos aminoacídicos modificados seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica, y un aminoácido conjugado a un agente de derivación orgánico.
- 35
7. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido ActRIIB soluble tiene una o más de las siguientes características:
- se une a un ligando ActRIIB con un K_d de al menos 10^{-5} M; e
- inhibe la señalización de ActRIIB en una célula.
- 40
8. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido ActRIIB soluble se une a un ligando ActRIIB con un K_d de menos de 1 micromolar.
9. El polipéptido ActRIIB soluble de la reivindicación 7 u 8, en el que el ligando ActRIIB se selecciona entre el grupo que consiste en: BMP7, GDF8, GDF11 y Nodal.
- 45
10. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio de unión a GDF8 alterado incluye una mutación A64R, usando la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 50
11. El polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio de unión a GDF8 alterado incluye una mutación K74A, usando la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
12. Una preparación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno asociado a ActRIIB, que comprende:
- 55 el polipéptido ActRIIB soluble de cualquier reivindicación anterior; y
- un transportador farmacéuticamente aceptable.
13. La preparación farmacéutica de la reivindicación 12, en la que dicha preparación es sustancialmente libre de pirógenos.
- 60
14. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia codificante para un polipéptido ActRIIB soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 65
15. Un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia promotora unida de forma operativa a un polinucleótido de la reivindicación 14.

16. Una célula transformada con un polinucleótido recombinante de la reivindicación 15.
- 5 17. La célula de la reivindicación 16, en la que la célula es una célula de mamífero.
18. La célula de la reivindicación 17, en la que la célula es una célula humana.
19. Un procedimiento de elaboración de un polipéptido ActRIIB soluble, que comprende:
- 10 a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIB soluble, en el que dicha célula se transforma con un polinucleótido recombinante de la reivindicación 15; y
- b) recuperar el polipéptido ActRII soluble expresado de este modo.
- 15 20. Un polipéptido ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular.
21. El polipéptido ActRIIB para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la distrofia muscular se selecciona entre el grupo que consiste en: Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia Muscular de Becker, Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss, Distrofia Muscular de Limb-Girdle, Distrofia Muscular Fasciocupulohumeral, Distrofia Muscular Miotónica, Distrofia Muscular Oculofaríngea, Distrofia Muscular Distal y Distrofia Muscular Congénita.
- 20 22. Un polipéptido ActRIIB de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.
- 25 23. Un polipéptido ActRIIB de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de un trastorno de desgaste muscular, en el que el trastorno de desgaste muscular se selecciona entre el grupo que consiste en caquexia, anorexia, síndrome DMD, síndrome BMD, síndrome de desgaste por SIDA, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares, enfermedades de neurona motora, enfermedades de la unión neuromuscular y miopatías inflamatorias.
- 30 24. Un polipéptido ActRIIB de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, en el que el trastorno neurodegenerativo se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington (EH).
- 35 25. Un polipéptido ActRIIB de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con una ganancia de peso corporal no deseada, en el que dicho trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en obesidad, diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI), enfermedad cardiovascular, cáncer, hipertensión, osteoartritis, ictus, problemas respiratorios y enfermedad de la vesícula biliar.
- 40 26. Un polipéptido ActRIIB de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con una actividad anormal de GDF-8, en el que el trastorno asociado con una actividad anormal de GDF-8 se selecciona entre el grupo que consiste en: trastornos metabólicos, tales como diabetes de tipo 2, tolerancia de glucosa alterada, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), y resistencia a insulina inducida por trauma (por ejemplo quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos de tejido adiposo (por ejemplo, obesidad), distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular; atrofia de órganos; debilidad; síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, y otros síndromes de desgaste muscular, osteoporosis; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; fracturas relacionadas con osteoporosis, masa ósea de bajo nivel debido a terapia glucocorticoide crónica, fallo gonadal prematuro, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa.
- 45 50

Secuencia de polipéptido ActRIIA soluble humana (extracelular) designada como
SEQ ID NO: 1 (116aa).

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPF

Figura 1

Secuencia de polipéptido ActRIIB soluble humana (extracelular) designada como SEQ ID NO: 2 (116aa).

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT

Figura 2

Secuencia precursora ActRIIA humana designada como SEQ ID NO: 3
(NP_001607, 513aa).

MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP CYGD KDRRH
CFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINC YDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTOPTSNPVTPKPPYNNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQD
PGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVY
SLPGMKHENILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAET
MARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG LALKFEAGKSAG
DTHGQVGT RRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYML
PFEEIIGQHPSLEDMQEVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSA
GCVGERITQMQLRTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL

Figura 3

Secuencia precursora ActRIIB humana designada como
SEQ ID NO: 4 (NP_001097, 512aa).

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHC
YASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE
AGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG
PPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST
PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIIITWNELCHVAETMS
RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGD
THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP
FEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG
CVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESI

Figura 4

Secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIA soluble humano (extracelular), designado como SEQ ID NO: 5 (348 pb).

```
Gctataacttggtagatcagaaactcaggagtgtctttctttaatgctaattgggaaaaagacagaacc  
aatcaaactggtggtgaaccgtgttatggtgacaaagataaacggcggcattgttttgctacctggaag  
aatatttctggtccattgaaatagtgaaacaaggttggtggctggatgatatcaactgctatgacagg  
actgattgtgtagaaaaaaaagacagccctgaagtatattttggctgtgagggcaatargtghtaat  
gaaaagtttcttattttccagagatggaagtacacagcccacttcaaattccagttacacctaagcca  
ccc
```

Figura 5

Secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB soluble humano (extracelular), designado como SEQ ID NO: 6 (348 pb).

```
Tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcacc  
aaccagagcggcctggagcgtgcaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctgggcc  
aacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggctgctggctagatgacttcaactgctacgatagg  
caggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaac  
gagcgttcactcatctgcccagaggctgggggcccgggaagtcaagctacgagccacccccgacagcccc  
acc
```

Figura 6

Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora ActRIIA humana, designada como SEQ ID NO: 7 (nucleótidos 164-1705 de NM_001616, 1542 pb).

atgggagctgctgcaaagttggcgtttgccgtctttcttatctcctgttcttcaggtgctataacttgg
 agatcagaaactcaggagtgctctttctttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaatcaaactgg
 gttgaaccgtgttatggtgacaaagataaaacggcggcattgttttgctacctggaagaataattctgg
 tccattgaaatagtgaaacaagggtgttggctggatgatatacaactgctatgacaggactgattgtgta
 gaaaaaaaaagacagccctgaagtataattttgtgctgtgagggcaataatgtgtaatgaaaagtttct
 tattttccagagatggaagtcacacagcccacttcaaatccagttacacctaaagccacctattacaac
 atcctgctctattccttgggtgccacttatgttaattgocgggatgtcatttgtgcattttgggtgtac
 aggcatacacaagatggcctaccctcctgtaacttgttccaactcaagaccaggaccacccccactct
 ccattactaggggtgaaaccactgcagttatagaagtgaagcaaggggaagatttgggtgtgtctgg
 aaagcccagttgcttaacgaatatgtggctgtcaaaatatttccaatacaggacaaacagttatggcaa
 aatgaatacgaagtctacagtttgccctggaatgaagcatgagaacatattacagttcattgggtgcagaa
 aaacgaggcaccagtggtgatgtggatcttggctgatcacagcatttcatgaaaagggttcactatca
 gactttcttaaggctaattgtggtctcttggaatgaactgtgtcatattgcagaaaccatggctagagga
 ttggcatatttacatgaggatatacctggcctaaaagatggccacaaacctgccatattctcacagggac
 atcaaaagtaaaaatgtgctgttgaaaaacaacctgacagcttgcatgtctgactttgggttggcctta
 aaatttgaggctggcaagtctgcaggcgatacccatggacaggttggtaaccggagggtacatggctcca
 gaggtatagaggggtgctataaaacttccaaagggatgcatttttgaggatagatatgtatgccatggga
 ttagtcctatgggaactggcttctcgctgtaactgctgcagatggacctgtagatgaatacatgttgcca
 tttgaggaggaaattggccagcatccatctcttgaagacatgcaggaagtgttgtgcataaaaaaaaaag
 aggcctgtttaagagattattggcagaaacatgctggaatggcaatgctctgtgaaaccaattgaagaa
 tgttgggatcacgacgcagaagccaggttatcagctggatgtgtagggtgaaagaattaccagatgcag
 agactaacaataattattaccacagaggacattgtaacagtggtcacaatggtgacaaatgttgacttt
 cctcccaaagaatctagtctatga

Figura 7

Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora ActRIIB humana, designada como SEQ ID NO: 8 (nucleótidos 5-1543 de NM_001106, 1539 pb).

```

atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggccccggctctgggcgtggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctg
gagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgctacgcctcctgggccaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaaggctgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtggtggcc
actgaggagaacccccagggtgacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttcaactcat
ttgccagaggctgggggcccgaagtcacgtagcagccacccccgacagccccaccctgctcacgggtg
ctggcctactcaactgctgcccatcgggggcctttccctcatcgctcctgctggccttttggatgtaccgg
catcgcaagccccctacgggtcatgtggacatccatgaggaccctgggcctccaccaccatcccctctg
gtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttcccactccaggacaagcagtcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcagagaacctgctacagttcatgtctgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcaeggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaaggggaacatcatcacatggaacgaaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttoga
tttgagccagggaaaacctccaggggacacccaaggacaggtaggcacgagacgggtacatggctcctgag
gtgctcgagggagccatcaacttccagagagatgccttccctgcgcattgacatgtatgccatggggttg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggaccctggatgagtagctgctgcccttt
gaggaagagattggccagcacccttcgctgggaggagctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcaactggttgaacaaccccgggcctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgc
tgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtgtggaggagcgggtgtccctgattcgggagg
tcggtcaacggcactacctcggaactgtctcgtttccctgggtgacctctgtcaccaatgtggacctgccc
cctaaagagtcaagcatctaa
    
```

Figura 8

Expresión de los dominios extracelulares de ActRIIA y ActRIIB

Características generales básicas de las construcciones



■ Secuencia señal: Nativa, melitina de miel de abeja o TPA

■ Dominio extracelular

■ Fc mutado
- unión del receptor Fc reducida y activación complementaria
- semivida aumentada en circulación

Secuencia ActRIIB humana

Secuencia señal nativa

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYNANWELERTNQSGL
ERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVAT
EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

Secuencia señal HBML

MKFLVNVALVFMVVYISYIYASGRGEAETRECIYNANWELERTNQSG
LERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV
ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

Secuencia señal TPA

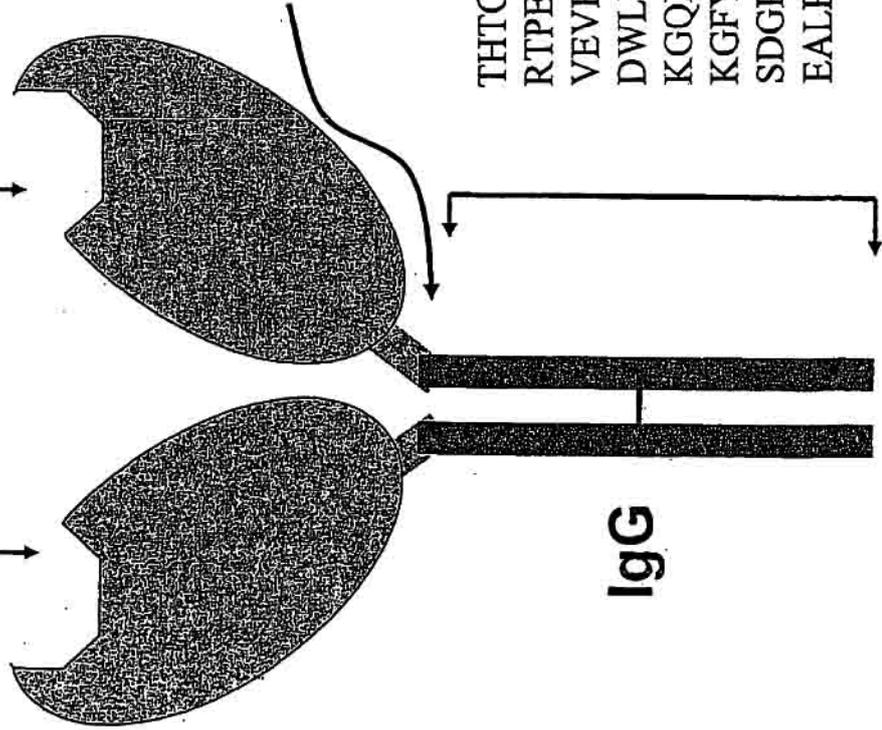
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGRGEAETRECIYNANWELERTN
QSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

ActR1la humano con secuencia señal nativa

MGAAAKLAFVVISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVPEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSP
EYFFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP

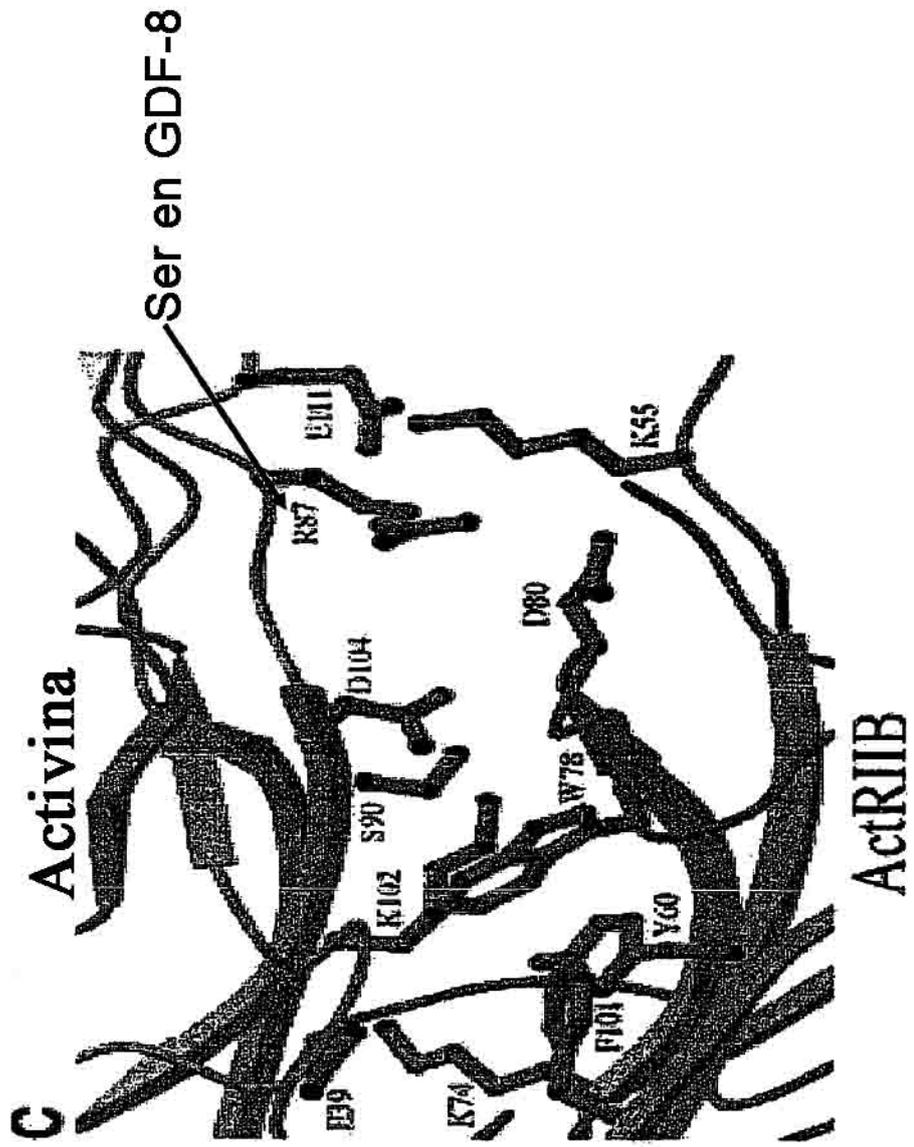
Diseño de productos Fc

Dominio extracelular de ActRIIa, ActRIIb



THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVD(A)VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVIIEKTISKA
KGGPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
EALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

Interacciones de ActRIIb en Activina



Alineación de los dominios extracelulares humanos de ActRIIA y ActRIIB

```

RIIA 20  AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLEDD 82
          G +ET+EC+++NANWE +RTNQ+G+E C G++DKR HC+A+WEN SG+IE+VK+GCWLDD
RIIB 19  SGRGEAETRECIYYNANWELELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLEDD 81

      83  FNCYDR TDCVEK KDSPEV FCCCEGN MCNEK FSYFPE MEV TOPT SNPV TPK FF 135
          NCYDR +CV +++P+VYFCCCEGN CNE+F++ PE F F T P P P
      82  FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPL 134
    
```

Figura 14

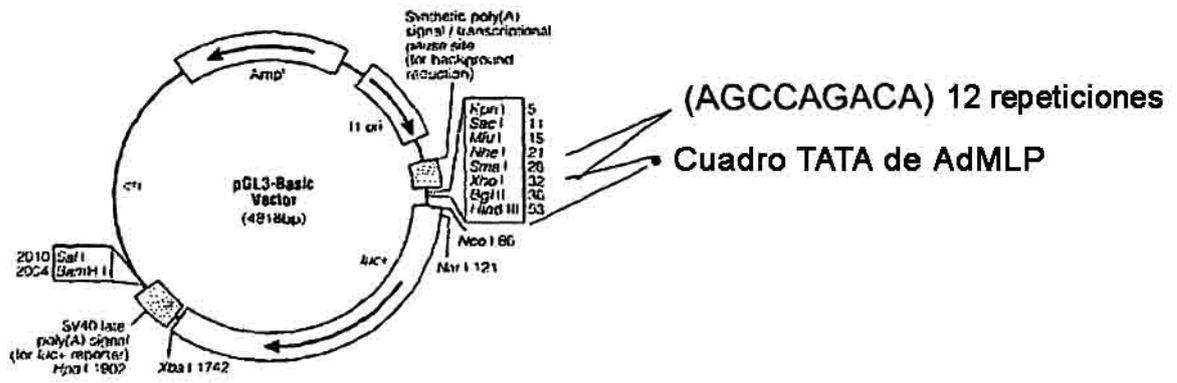


Figura 15

