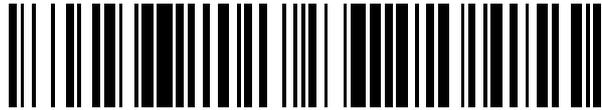


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 695**

51 Int. Cl.:

**A61P 19/08** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**C07K 14/51** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10759315 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2414043**

54 Título: **Antagonistas de BMP-ALK3 y sus usos para estimular el crecimiento óseo**

30 Prioridad:

**30.03.2009 US 211557 P**  
**19.02.2010 US 306331 P**  
**16.03.2010 US 314556 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SEEHRA, JASBIR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 575 695 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Antagonistas de BMP-ALK3 y sus usos para estimular el crecimiento óseo

**Antecedentes de la invención**

5 Los trastornos asociados a los huesos, que van desde la osteoporosis a las fracturas, representan un conjunto de estados patológicos para los que hay pocos agentes farmacéuticos efectivos. Los tratamientos se centran, en cambio, en intervenciones físicas y de comportamiento, como la inmovilización, el ejercicio y los cambios en la dieta. Sería beneficioso disponer de agentes terapéuticos que promovieran el crecimiento óseo y aumenten la densidad ósea con el fin de tratar una variedad de trastornos de los huesos.

10 El crecimiento óseo y la mineralización dependen de las actividades de los dos tipos de células, osteoclastos y osteoblastos, aunque los condrocitos y las células de la vasculatura también participan en los aspectos críticos de estos procesos. Durante el desarrollo, la formación de los huesos se produce a través de dos mecanismos, osificación endocondral y osificación intramembranosa, siendo la primera responsable de la formación del hueso longitudinal y la segunda responsable de la formación de huesos topológicamente planos, tales como los huesos del cráneo. La osificación endocondral requiere la formación secuencial y la degradación de las estructuras cartilaginosa

15 en las placas de crecimiento que sirven como plantillas para la formación de los osteoblastos, los osteoclastos, la vasculatura y la posterior mineralización. Durante la osificación intramembranosa, el hueso se forma directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de los osteoblastos y la posterior deposición de la matriz.

20 Las fracturas y otras perturbaciones estructurales del hueso se curan a través de un proceso que, al menos superficialmente, se asemeja a la secuencia de eventos de desarrollo de la osteogénesis, incluyendo la formación de tejido cartilaginoso y la posterior mineralización. El proceso de curación de la fractura puede producirse de dos maneras. La cicatrización ósea directa o primaria se produce sin la formación de callos. La cicatrización ósea indirecta o secundaria se produce con una etapa precursora del callo. La cicatrización primaria de las fracturas implica la reforma de la continuidad mecánica a través de una ruptura estrechamente establecida. En condiciones adecuadas, las células de resorción ósea que rodean la rotura muestran una respuesta de resorción de túnel y establecen vías para la penetración de los vasos sanguíneos y la posterior curación. La curación de los huesos secundaria sigue un proceso de inflamación, la formación de callo blando, la mineralización del callo y la remodelación del callo. En la etapa de la inflamación, la formación de hematomas y de hemorragias da como resultado la alteración de los vasos sanguíneos del periostio y endoóseos en el sitio de la lesión. Las células inflamatorias invaden la zona. En la etapa de formación del callo blando, las células producen nuevos vasos, fibroblastos, material intracelular y células de soporte, formando un tejido de granulación en el espacio entre los fragmentos de la fractura. La unión clínica a través de la rotura es establecida por el tejido fibroso o el cartilaginoso (callo blando). Se forman osteoblastos y median en la mineralización del callo blando, que es reemplazado luego por el hueso laminar y sometido a los procesos de remodelación normales.

35 Además de las fracturas y otras perturbaciones físicas de la estructura ósea, la pérdida de contenido mineral del hueso y de la masa ósea puede estar causada por una amplia variedad de condiciones y puede resultar en problemas médicos significativos. Los cambios en la masa ósea se producen de una manera relativamente predecible durante la vida de un individuo. Hasta aproximadamente los 30 años, los huesos de los hombres y de las mujeres crecen a la masa máxima por medio del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondral y crecimiento radial. Después de aproximadamente los 30 años de edad (para el hueso trabecular, por ejemplo, los huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y a los 40 años de edad (para el hueso cortical, por ejemplo, los huesos largos encontrados en las extremidades), se produce una pérdida ósea lenta tanto en hombres como en mujeres. En las mujeres, también se produce una fase final de la pérdida ósea sustancial, probablemente debido a las deficiencias de estrógenos post-menopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y un 25% del compartimento trabecular. Si la pérdida de hueso progresiva da como resultado una condición patológica, tal como la osteoporosis, ésta depende en gran medida de la masa ósea inicial de la persona y de si existen condiciones que la agravan.

50 La pérdida de hueso a veces se caracteriza como un desequilibrio en el proceso de remodelación ósea normal. El hueso sano es constantemente objeto de remodelación. La remodelación comienza con la resorción de hueso por los osteoclastos. El hueso reabsorbido se sustituye entonces por el nuevo tejido óseo, que se caracteriza por la formación de colágeno por los osteoblastos y la posterior calcificación. En las personas sanas, las tasas de resorción y formación están equilibradas. La osteoporosis es una condición progresiva y crónica, marcada por un cambio hacia la resorción, lo que resulta en una disminución global de la masa ósea y la mineralización ósea. La osteoporosis en seres humanos está precedida de la osteopenia clínica (una densidad mineral ósea que es mayor que una desviación estándar, pero menos que 2,5 desviaciones estándar por debajo del valor medio para el hueso de un adulto joven). A nivel mundial, aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de padecer osteoporosis.

55 Por lo tanto, los métodos para controlar el equilibrio entre los osteoclastos y la actividad de los osteoblastos pueden ser útiles para promover la curación de fracturas y otros daños al hueso, así como el tratamiento de trastornos, tales como la osteoporosis, asociados a la pérdida de masa ósea y a la mineralización ósea.

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

5

La pérdida de hueso es también una complicación importante de muchos tipos de cáncer y puede estar causada por metástasis tumoral en los huesos, la activación de los osteoclastos o los efectos del tratamiento quimioterapéutico. En particular, las terapias anti-estrógeno que se utilizan ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama pueden causar una pérdida ósea significativa.

10 Otros trastornos de los huesos, tales como la osteogénesis imperfecta, pueden resultar como consecuencia de la genética, del desarrollo, de la nutrición de otras patologías y deficiencias.

Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar composiciones y métodos para promover el crecimiento del hueso y su mineralización.

Resumen de la invención

15 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

El polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y/o puede ser al menos 95% puro, con respecto a contaminantes proteicos, como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaños. El polipéptido puede exhibir una constante de disociación para BMP2 o BMP4 de no más que  $10^{-8}$  M.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de codificación para el polipéptido del primer aspecto. El polinucleótido aislado puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia promotora operativamente unida a un polinucleótido del segundo aspecto.

25 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de BMP o ALK3 para uso en un método para promover el crecimiento óseo, aumentar la densidad ósea o aumentar la resistencia ósea, o para uso en un método para tratar o prevenir un trastorno óseo, en el que el antagonista de BMP o ALK3 se selecciona a partir del grupo que consiste en:

30 a) un polipeptido soluble que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 3;

b) un anticuerpo que se une a BMP2 e inhibe la interacción entre BMP2 y ALK3;

c) un anticuerpo que se une a BMP4 e inhibe la interacción entre BMP4 y ALK3;

d) un anticuerpo que se une a ALK3 e inhibe la interacción entre ALK3 y uno o más ligandos de ALK3; y

35 e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a los aminoácidos 8-117 de SEQ ID NO: 3 o 100% idéntica a los aminoácidos 8-117 de SEQ ID NO: 3.

El polipéptido de (a) o (b) puede tener uno o más de las siguientes características: i) se une a un ligando de ALK3 con una  $K_D$  de al menos  $10^{-7}$  M; e ii) inhibe la señalización de ALK3 en una célula, puede incluir uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados a partir de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico y/o puede no unirse a BMP6 humano o a BMP7 humano.

40

El antagonista puede ser una proteína de fusión que incluya, además de un dominio del polipéptido de ALK3, una porción del polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina de suero.

45 La enfermedad ósea que se trata o previene puede ser seleccionada a partir del grupo que consiste en: osteoporosis primaria, osteoporosis secundaria, osteoporosis post-menopáusica, pérdida ósea hipogonadal, pérdida ósea inducida por tumor, pérdida ósea inducida por terapia cancerígena, metástasis óseas, mieloma múltiple y enfermedad de Paget.

50 En el antagonista para uso del cuarto aspecto, el método puede comprender además administrar un segundo agente activo óseo, que puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un estrógeno, un

modulador del receptor de estrógeno selectivo, una hormona paratiroide, una calcitonina, un suplemento de calcio y un suplemento de vitamina D.

5 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un antagonista del polipéptido BMP o ALK3 que comprende una primera secuencia de aminoácidos a partir del dominio extracelular de ALK3 humano y una secuencia de aminoácidos heteróloga, en la que la primera secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia que comienza en cualquiera de las posiciones 25 a 31 de SEQ ID NO:1 y que termina en cualquiera de las posiciones 140 a 152 de SEQ ID NO:1.

La secuencia de aminoácidos heteróloga puede comprender un dominio constante de un anticuerpo o un dominio de Fc de una IgG, preferiblemente IgG1 humana.

10 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que sea al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 y 41.

15 El polipéptido del sexto aspecto puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 y 41.

20 El polipéptido del primer y sexto aspecto puede estar glicosilado, puede estimular formación ósea o aumentar la densidad mineral ósea en un animal o puede producirse mediante expresión en una célula CHO. El polipéptido del sexto aspecto puede estar codificado mediante un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que sea al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada a partir de: SEQ ID NOs: 12, 15, 21, 24, 27, 32 y 37. El polipéptido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada a partir de: SEQ ID NOs: 12, 15, 21, 24, 27, 32 y 37.

25 La invención también proporciona un homodímero que comprende dos polipéptidos del primer aspecto o dos polipéptidos del segundo aspecto, así como una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido del primer aspecto o del sexto aspecto o dicho homodímero y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La preparación farmacéutica puede estar libre de pirógenos.

30 También se proporciona mediante la invención una célula que comprende el polinucleótido del segundo aspecto o un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que sea al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada a partir de: SEQ ID NOs: 12, 15, 21, 24, 27, 32 y 37. El polipéptido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada a partir de: SEQ ID NOs: 12, 15, 21, 24, 27, 32 y 37. La célula puede ser una célula mamífera, tal como una célula CHO o una célula humana.

35 En parte, la descripción demuestra que las moléculas que tienen actividad antagonista de ALK3 o BMP ("antagonistas de ALK3" y "antagonistas de BMP") se pueden utilizar para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento del hueso y/o aumentar la resistencia ósea. Esta observación es particularmente sorprendente, dada la gran cantidad de literatura y experiencia clínica que indica que muchos BMP, y particularmente BMP2, BMP4 y BMP7, son potentes estimuladores de la formación del hueso. La descripción demuestra que una forma soluble de ALK3 actúa como un inhibidor de la señalización de BMP-ALK3 y promueve el aumento de la densidad ósea, del crecimiento óseo y de la resistencia del hueso in vivo. Aunque no se desea estar ligado a ningún mecanismo particular, parece que la forma soluble de ALK3 logra este efecto mediante la inhibición de BMP2 y/o BMP4, y tal vez otros ligandos que señalizan a través de ALK3. Por lo tanto, la descripción establece que se pueden usar los antagonistas de la vía de señalización de BMP-ALK3 para aumentar la densidad ósea y promover el crecimiento óseo. Mientras que el ALK3 soluble puede afectar al hueso a través de un mecanismo distinto, o además, del antagonismo de BMP, la descripción, sin embargo, demuestra que se pueden seleccionar agentes terapéuticos deseables sobre la base de la actividad antagonista de BMP-ALK3. Por lo tanto, pueden usarse antagonistas de BMP-ALK3, incluyendo, por ejemplo, los polipéptidos de ALK3 que se unen a BMP, anticuerpos anti-BMP, anticuerpos anti-ALK3, anticuerpos de pequeñas moléculas dirigidas contra BMP o ALK3 y aptámeros de ALK3 y ácidos nucleicos que disminuyen la expresión de BMP y ALK3, para tratar trastornos asociados con la baja densidad ósea o la baja resistencia ósea, tales como la osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes en necesidad del mismo, tales como en pacientes que tienen fracturas de hueso. En ciertas realizaciones, la invención proporciona formas truncadas de polipéptidos de ALK3 (por ejemplo, polipéptidos de ALK3-Fc) que tienen propiedades ventajosas y que retienen la apropiada unión de BMP2 o BMP4.

55 Se describen en este documento polipéptidos que comprenden un polipéptido de ALK3 soluble que se une a BMP2 y/o BMP4. El polipéptido de ALK3 soluble puede unirse a ligandos adicionales también. Los polipéptidos de ALK3 se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprenda el polipéptido de ALK3 que se une a BMP y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el polipéptido de ALK3 que se une a BMP se une a BMP2 y/o BMP4 con una  $K_D$  de menos de 1 micromolar o inferior a 100, 10 ó 1 nanomolar. Preferiblemente, la composición es al menos 95% pura, con respecto a otros componentes de polipéptidos, como se evaluó por cromatografía de exclusión por tamaños, y más preferiblemente, la composición es al menos un 98% pura. Un polipéptido de ALK3

que se une a BMP para su uso en una preparación puede ser cualquiera de los descritos en este documento, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 ó 41, o que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 ó 41, incluyendo truncamientos N- y/o C-terminales de no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y, opcionalmente, fusionado a una proteína de fusión Fc, con o sin un enlazador. En particular, la descripción proporciona polipéptidos de ALK3 con un truncamiento de 0 a 7 aminoácidos en el extremo N-terminal de la porción ECD de ALK3 y de 0 a 12 aminoácidos en el extremo C-terminal de la porción ECD de ALK3, describiendo de este modo una porción de la función correspondiente a los aminoácidos 8 a 117 de SEQ ID NO: 3 y los polipéptidos que comprenden una proteína que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de 8 a 117 de SEQ ID NO: 3. Notablemente, el ALK3 humano y el ALK3 murino tienen de un 97 a un 98% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos en el dominio extracelular, y las proteínas que comprenden dichos dominios de la proteína humana o de ratón se muestran en este documento que exhiben una actividad similar *in vitro* e *in vivo*. Un polipéptido de ALK3 que se une a BMP puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ALK3 natural, tal como uno que comprenda al menos 10, 20 ó 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1 ó 3. Sorprendentemente, como se demuestra en el presente documento, las proteínas ALK3 que incluyen una delección de aminoácidos en la región C-terminal del dominio extracelular de ALK3 retienen actividad contra BMP2 y BMP4 mientras que disminuyen la actividad contra otros ligandos (por ejemplo, BMP6 y BMP7) proporcionando así una mejora en la selectividad del ligando, que es generalmente deseable para disminuir los imprevistos efectos desplazados del objetivo en el desarrollo clínico o la comercialización. Tales variaciones pueden incluir una delección de no más de 6 ó 7, no más de 12 o no más de 24 aminoácidos del extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 3. Opcionalmente, una forma truncada en el extremo C-terminal también puede ser truncada por no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 aminoácidos en el extremo N-terminal. Las variaciones mencionadas anteriormente de proteínas ALK3 se pueden incluir en una proteína de fusión de ALK3-Fc, que puede comprender cualquier enlazador descrito en este documento (o ningún enlazador en absoluto), incluyendo un enlazador que tiene la secuencia GGG o TGGG o SGGG, y una porción de Fc derivada de una IgG1 humana, IgG2, IgG3 o IgG4 u otra inmunoglobulina de mamífero.

Un polipéptido ALK3 que se une a BMP soluble puede incluir uno, dos, cinco o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión al ligando) con relación a un polipéptido de ALK3 de origen natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula eucariota de mamífero, insecto u otro o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con relación al polipéptido de ALK3 de origen natural.

Un polipéptido de ALK3 que se une a BMP puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido de ALK3 (por ejemplo, una porción de unión de ligando de ALK3) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tales como la mejora de la farmacocinética, una más fácil purificación, la dirección a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de la estabilidad *in vivo*, la semivida *in vivo*, la absorción/administración, la localización o la distribución en el tejido, la formación de complejos de proteínas, la multimerización de la proteína de fusión y/o la purificación. Una proteína de fusión de ALK3 que se une a BMP puede incluir un dominio de inmunoglobulina Fc (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina de suero u otra porción de polipéptido que proporcione propiedades deseables, tales como la mejora de la farmacocinética, la mejora de la solubilidad o una mejor estabilidad. En una realización preferida, una fusión ALK3-Fc comprende un enlazador relativamente poco estructurado situado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ALK3. Este enlazador no estructurado puede corresponder al extremo C-terminal del dominio extracelular de ALK3, o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos o una longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que son relativamente libres de la estructura secundaria, o una mezcla de ambos. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una única secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias de repetición de treonina/serina y/o glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones de GGG, GGGG, TG<sub>4</sub>, SG<sub>4</sub>, TG<sub>3</sub> o SG<sub>3</sub>). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un marcador de epítipo, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido de ALK3 soluble incluye uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados a partir de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se utilice para tratar un trastorno óseo. Preferiblemente, la preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que la proteína de ALK3 sea expresada en una línea celular de mamífero que medie la glicosilación adecuada natural de la proteína de ALK3 a fin de disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Han sido utilizadas con éxito líneas celulares humanas y CHO y se espera que otros sistemas de expresión de mamíferos comunes serán útiles.

La descripción proporciona también ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de ALK3 que se une a BMP soluble. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido de ALK3 que se une a BMP soluble, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifique para un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión de ligando) de ALK3 y una

5 secuencia que codifique una parte o todo del dominio de transmembrana y/o el dominio citoplásmico de ALK3, pero para un codón de parada situado dentro del dominio de transmembrana o del dominio citoplasmático, o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótidos de ALK3 de longitud completa tal como SEQ ID NO: 2 ó 4, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo dicho polinucleótido aislado además un codón de terminación de la transcripción de al menos seis cientos nucleótidos antes del extremo 3' o posicionado de otra manera tal que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una parte truncada de un ALK3 de longitud completa. Las secuencias de ácido nucleico preferidas son SEQ ID NO: 12, 13, 15, 16, 19, 21, 24, 27, 32 ó 37 y los ácidos nucleicos que se hibridan con tales ácidos nucleicos o los complementos de los mismos en condiciones de hibridación rigurosas. Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden unirse operativamente a un promotor para la expresión y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

15 La descripción proporciona métodos para preparar un polipéptido de ALK3 que se une a BMP soluble. Tal método puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 4, 12, 13, 15, 16, 19, 21, 24, 27, 32 ó 37) descritos en este documento en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de ALK3 soluble, en el que dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ALK3 soluble; y b) recuperar el polipéptido de ALK3 soluble así expresado. Los polipéptidos de ALK3 solubles pueden ser recuperados como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación se puede conseguir mediante una serie de etapas de purificación, incluyendo, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q Sepharose), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio catiónico.

25 Un antagonista de BMP-ALK3 descrito en el presente documento, tal como un polipéptido de ALK3 que se une a BMP soluble, se puede utilizar en un método para promover el crecimiento del hueso o aumentar la densidad ósea en un sujeto. La descripción proporciona métodos para tratar un trastorno asociado con la baja densidad ósea o para promover el crecimiento óseo en pacientes en necesidad del mismo. Un método puede comprender administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz del antagonista de BMP-ALK3. La descripción proporciona usos del antagonista de BMP-ALK3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o una afección como se describe en este documento.

35 La descripción proporciona un método para identificar un agente que estimula el crecimiento o el aumento de la mineralización del hueso. El método comprende: a) identificar a un agente de ensayo que se una a BMP o un dominio de unión a ligando de un polipéptido de ALK3; y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento o la mineralización del hueso.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos nativa del precursor de ALK3 humano (SEQ ID NO: 1). El dominio extracelular de ALK3 (restos 24-152) está subrayado.

40 La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos nativa que codifica el precursor de ALK3 humano (SEQ ID NO: 2). La secuencia que codifica el dominio extracelular de ALK3 (nucleótidos de 70 a 456) está subrayada.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos nativa del dominio extracelular de ALK3 humana (SEQ ID NO: 3).

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos nativa que codifica el dominio extracelular de ALK3 humana (SEQ ID NO: 4).

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos nativa del dominio de IgG1 Fc humano (SEQ ID NO: 5).

45 La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos nativa que codifica el dominio de IgG1 Fc humano (SEQ ID NO: 6).

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos hALK3(24-152)-hFc sin líder (SEQ ID NO: 7). El dominio extracelular de ALK3 humano (SEQ ID NO: 3) está subrayado, y la secuencia de enlazador TGGG está en negrita.

50 La Figura 8 muestra la secuencia completa de aminoácidos de hALK3(24-152)-hFc con el líder TPA (SEQ ID NO: 11). El dominio extracelular de ALK3 humano (SEQ ID NO: 3) está subrayado, y la secuencia del enlazador TGGG está en negrita.

La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica hALK3(24-152)-hFc con el líder TPA. La SEQ ID NO: 12 corresponde a la cadena codificante, y la SEQ ID NO: 13 corresponde a la hebra anti-codificación. La secuencia que codifica el dominio extracelular de ALK3 humano (SEQ ID NO: 4) está subrayada.

La Figura 10 muestra la secuencia completa de aminoácidos de hALK3(24-152)-mFc con el líder TPA (SEQ ID NO: 14). El dominio extracelular de ALK3 humano (SEQ ID NO: 3) está subrayado y la secuencia del enlazador TGGG está en negra.

5 La Figura 11 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica hALK3(24-152)-mFc con el líder TPA. La SEQ ID NO: 15 corresponde a la cadena codificante, y la SEQ ID NO: 16 corresponde a la hebra anti-codificación. La secuencia que codifica el dominio extracelular de ALK3 humano (SEQ ID NO: 4) está subrayada.

10 La Figura 12 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc en todo el cuerpo de la densidad mineral ósea en ratones hembra. Las mediciones se realizaron mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Los datos son medias (n = 8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*\*, P <0,05 vs. vehículo mediante la prueba t no pareada. El hALK3(24-152)-mFc aumentó la densidad ósea de todo el cuerpo de manera significativa después de 31 y 42 días de tratamiento.

15 La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc sobre la densidad mineral ósea vertebral en ratones hembra. Las mediciones de una región que contiene la cuarta y quinta vértebras lumbares (L4, L5) fueron hechas por DEXA. Los datos son medias (n = 8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*\*, P <0,005 vs vehículo mediante la prueba t no pareada. El hALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente la densidad ósea vertebral después de 31 y 42 días de tratamiento.

20 La Figura 14 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc del espesor del hueso cortical en ratones hembra. Las mediciones de la tibia proximal derecha fueron hechas por tomografía microcomputarizada (micro-CT). Los datos son medias (n = 8 por grupo), y las barras de error representan  $\pm$  dos veces SEM. \*\*, P <0,005 vs vehículo mediante la prueba t no pareada. El hALK3(24-152)-mFc aumentó el espesor del hueso cortical significativamente después de 6 semanas de tratamiento.

25 La Figura 15 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc en volumen del hueso trabecular en ratones hembra. Las mediciones de la tibia proximal derecha fueron hechas por micro-CT. Los datos son medias (n = 8 por grupo), y las barras de error representan  $\pm$  dos veces SEM. \*\*\* P <0,001 frente a la línea de base de pretratamiento o vehículo mediante la prueba t no pareada. El hALK3(24-152)-mFc más que duplicó la proporción del hueso trabecular después de 4 semanas de tratamiento.

30 La Figura 16 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc del espesor trabecular medio en ratones hembra. Las mediciones de la tibia proximal derecha fueron hechas por micro-CT. Los datos son medias de los grupos (n = 8 por grupo), y las barras de error representan  $\pm$  dos veces SEM. \*\*\* P <0,001 frente a la línea de base de pretratamiento o vehículo mediante la prueba t no pareada. El hALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente el espesor trabecular después de 4 semanas de tratamiento.

La Figura 17 muestra el efecto del tratamiento con el tratamiento de hALK3(24-152)-mFc durante 4 semanas en la microarquitectura ósea trabecular en ratones hembra. Las imágenes tridimensionales representativas del hueso trabecular de la tibia proximal se generaron mediante micro-CT. Barras de escala = 300  $\mu$ m.

35 La Figura 18 muestra ejemplos de los tres enfoques descritos en este documento para interferir con la señalización por el eje de señalización de BMP-ALK3 con el propósito de estimular la formación del hueso. A: ALK3-Fc. B: anticuerpo contra el ligando o los ligandos BMP seleccionados. C. Anticuerpo contra la región de unión a ligando del dominio extracelular de ALK3. El "BMP2" se utiliza para ilustrar que el BMP puede ser BMP2, BMP4 u otro ligando de afinidad alta de ALK3.

40 La Figura 19 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc durante 6 semanas en carga máxima de hueso en ratones hembra. Se realizó un análisis unilateral del fémur ex vivo con un dispositivo de ensayo mecánico Instron. Los datos en newtons (N) son medias (n = 8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*\*, P <0,01 vs. vehículo. El hALK3(24-152)-mFc aumentó la carga máxima del hueso en un 30%.

45 La Figura 20 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc durante 6 semanas en la rigidez del hueso en ratones hembra. Se realizó un análisis unilateral del fémur ex vivo con un dispositivo de ensayo mecánico Instron. Los datos en newtons (N) por mm son medias (n = 8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*, P <0,05 vs. vehículo. El hALK3(24-152)-mFc aumentó la rigidez ósea en un 14%.

50 La Figura 21 muestra el efecto del tratamiento con hALK3(24-152)-mFc durante 6 semanas sobre la energía para la insuficiencia de la médula en ratones hembra. Se realizó un análisis unilateral del fémur ex vivo con un dispositivo de ensayo mecánico Instron. Los datos en milijulios (mJ) son medias (n = 8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*, P <0,05 vs. vehículo. El hALK3(24-152)-mFc aumenta la energía a un fallo en un 32%.

55 La Figura 22 muestra el efecto del tratamiento con mALK3 (24-152)-mFc en el volumen del hueso trabecular en un modelo de ratón OVX de osteopenia establecida. Las mediciones de la tibia proximal fueron hechas por micro-CT. Los datos son medias (n = 7-8 por grupo) y las barras de error representan  $\pm$  2 SEM. \*, P <0,05 vs. OVX + vehículo. Antes de la administración, los ratones OVX habían reducido el volumen de hueso trabecular en comparación con

los ratones con operación simulada. En comparación con los controles OVX, mALK3 (24-152)-mFc aumentó el volumen del hueso significativamente a los 28 y 56 días de tratamiento.

5 La Figura 23 muestra el efecto del tratamiento con mALK3 (24-152)-mFc del espesor del hueso cortical en un modelo de ratón OVX de osteopenia. Las mediciones de hueso cortical fueron hechas por micro-CT. Los datos son medias (n = 7-8 por grupo) y las barras de error representan  $\pm 2$  SEM. \*, P <0,05 vs. OVX + vehículo. En comparación con los controles OVX, mALK3 (24-152)-mFc aumentó el espesor cortical significativamente a los 56 días de tratamiento.

10 La Figura 24 muestra el efecto del tratamiento con mALK3 (24-152)-mFc en la circunferencia endoósea en un modelo de ratón OVX de osteopenia. Las mediciones de la diáfisis tibial fueron hechas por micro-CT. Los datos son medias (n = 7-8 por grupo) y las barras de error representan  $\pm 2$  SEM. \*, P <0,05 vs. OVX + vehículo. En comparación con los controles OVX, el mALK3 (24-152)-mFc redujo la circunferencia endoósea significativamente a los 56 días de tratamiento, proporcionando así una evidencia adicional del crecimiento del hueso cortical.

15 La Figura 25 muestra el efecto del tratamiento con mALK3 (24-152)-mFc en todo el cuerpo de la densidad mineral ósea en un modelo de ratón OVX de osteopenia como se determina por DEXA. Los datos son medias (n = 7-8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*, P <0,05 vs. OVX + vehículo. En comparación con los controles OVX, mALK3 (24-152)-mFc aumentó en todo el cuerpo la densidad ósea de forma significativa a los 14, 28, 42 y 56 días de tratamiento.

20 La Figura 26 muestra el efecto del tratamiento con mALK3 (24-152)-mFc sobre la densidad mineral ósea vertebral en un modelo de ratón OVX de osteopenia. El análisis de la columna lumbar (vértebras L1-L6) se llevó a cabo mediante DEXA. Los datos son medias (n = 7-8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*, P <0,05 vs. OVX + vehículo. En comparación con los controles OVX, mALK3 (24-152)-mFc aumentó significativamente la densidad ósea vertebral a los 14, 28, 42, y 56 días de tratamiento.

25 La Figura 27 muestra el efecto del tratamiento con mALK3-mFc sobre la densidad mineral ósea de fémur-tibia en un modelo de ratón OVX de osteopenia como se determina por DEXA. El análisis de toda la tibia proximal y del fémur se llevó a cabo por DEXA. Los datos son medias (n = 7-8 por grupo)  $\pm$  SEM. \*, P <0,05 vs. OVX + vehículo. En comparación con los controles OVX, mALK3 (24-152)-mFc aumentó la densidad ósea femorotibial significativamente a los 28, 42, y 56 días de tratamiento.

La Figura 28 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc durante 56 días en la microarquitectura ósea vertebral en un modelo de ratón OVX de osteopenia. Se generaron imágenes tridimensionales representativas del hueso trabecular en la vértebra lumbar (L5) ex vivo mediante micro-CT. Barra de escala = 300 micras.

30 La Figura 29 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en el volumen de hueso en ratones hembra como se evaluó en el fémur distal por histomorfometría. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo por punto de tiempo. \*\*, P <0,01 frente al vehículo en los puntos de tiempo correspondientes. En comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc aumentó significativamente el volumen de hueso en todos los puntos de tiempo.

35 La Figura 30 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en la tasa de formación de hueso en ratones hembra como se evaluó en el fémur distal por histomorfometría. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo por punto de tiempo. \*\*\*, P <0,001 frente a vehículo en el punto de tiempo correspondiente. En comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc aumentó la tasa de formación de hueso significativamente a los 28 días de tratamiento, proporcionando así la evidencia de la formación ósea anabólica.

40 La Figura 31 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en la superficie de mineralización ósea en ratones hembra como se evaluó en el fémur distal por histomorfometría. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo por punto de tiempo. \*\*, P <0,01; \*, P <0,05 frente a vehículo en los puntos de tiempo correspondientes. En comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc aumentó la superficie de mineralización significativamente a los 14 y 28 días de tratamiento, lo que proporciona evidencia adicional de la formación ósea anabólica.

45 La Figura 32 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en la superficie de los osteoclastos en ratones hembra como se evaluó en el fémur distal por histomorfometría. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo por punto de tiempo. \*\*, P <0,01 frente al vehículo en el punto de tiempo correspondiente. En comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc reduce la superficie de los osteoclastos significativamente a los 28 días de tratamiento, proporcionando así la evidencia de la formación de hueso antirresortivo.

50 La Figura 33 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en los niveles séricos de RANKL (activador del receptor para el ligando  $\kappa$ B del factor nuclear) en ratones hembra como se determina por el ensayo Luminex xMAP®. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo por punto de tiempo. \*\*, P <0,01; \*, P <0,05 frente a vehículo en los puntos de tiempo correspondientes. En comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc reduce los niveles circulantes de RANKL significativamente en todos los puntos de tiempo.

55 La Figura 34 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en los niveles en suero de osteoprotegerina (OPG) en ratones hembra como se determina por el ensayo Luminex xMAP®. Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo por punto de tiempo. \*\*, P <0,01; \*, P <0,05 frente a vehículo en los puntos de tiempo correspondientes. En

comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc aumentó los niveles circulantes de OPG significativamente a los 28 y 42 días de tratamiento.

5 La Figura 35 muestra el efecto de mALK3 (24-152)-mFc en los niveles de ARNm de esclerostina en el fémur y la tibia de ratones hembra según la evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Los datos son medias  $\pm$  SEM. \*\*\*, P <0,001; \*, P <0,05 frente a vehículo en los puntos de tiempo correspondientes. En comparación con el vehículo, mALK3 (24-152)-mFc redujo los niveles de ARNm de esclerostina significativamente a los 2, 7 y 28 días de tratamiento.

10 La Figura 36 muestra el efecto de hALK3(24-152)-hFc en el volumen de hueso en ratones hembra. El volumen del hueso se evaluó en la tibia proximal por micro-CT en el día 0 (línea de base) y de nuevo en el día 42 (ex vivo). Los datos son medias  $\pm$  SEM; n = 6 por grupo. \*\*\*, P <0,001 vs vehículo. En el transcurso del experimento, el volumen óseo disminuyó en casi un 20% en los controles tratados con vehículo, pero aumentó en más de un 80% con el tratamiento de hALK3(24-152)-hFc.

Descripción detallada de la invención

### 1. Visión de conjunto

15 En parte, la presente descripción demuestra el sorprendente resultado de que los inhibidores de la vía de señalización de BMP-ALK3, tal como la proteína ALK3-Fc, promueven la formación del hueso en animales. El ALK3 es un receptor para los miembros de la superfamilia del factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta)/proteína morfogenética ósea (BMP). La superfamilia TGF-beta/BMP contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Estas proteínas son conocidas por ejercer efectos biológicos en una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo la adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y la diferenciación de las células epiteliales. Mediante la manipulación de la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piemontesa y azul belga llevan una mutación de pérdida de la función en el gen de GDF8 (también llamada miostatina) que causa un marcado incremento en la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17 (1): 71-4. Por otra parte, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con un aumento de la masa muscular y, según las publicaciones, con una resistencia excepcional. Schuelke et al, N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

35 Las señales de TGF- $\beta$  están mediadas por complejos heterómeros de los receptores de serina del tipo I y tipo II/treonina quinasa, que fosforilan y activan las proteínas Smad posteriores tras la estimulación de ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con la predicha especificidad de serina/treonina. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización; y se requieren receptores tipo II para unir ligandos y para la expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión del ligando, lo que resulta en la fosforilación de receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

40 La quinasa-3 del tipo receptor de activina (ALK3) es un receptor tipo I que media los efectos de múltiples ligandos en la familia BMP y también se conoce como receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo IA (BMPR1A), o receptor de activina A, quinasa tipo II (ACVRLK). A diferencia de varios receptores de tipo I con expresión tisular ubicua, el ALK3 muestra un patrón de expresión restringido consistente con una funcionalidad más especializada (Ten Dijke 1993, Oncogene 8: 2879-2887). El ALK3 se reconoce generalmente como un receptor de alta afinidad para BMP2, BMP4, BMP7 y otros miembros de la familia BMP. BMP2 y BMP-7 son potentes estimuladores de la diferenciación osteoblástica y ahora se utilizan clínicamente para inducir la formación de hueso en las fusiones de columna y ciertas fracturas no consolidadas. El ALK3 es considerado como un receptor clave en la mediación de la señalización de BMP2 y BMP4 en los osteoblastos (Lavery et al., 2008, J. Biol. Chem. 283: 20948- 20958). Un ratón ALK3 con genes desactivados homocigóticos muere en la embriogénesis temprana (día 9,5), sin embargo, se ha publicado recientemente que los ratones adultos que llevan una alteración condicional de ALK3 en los osteoblastos exhiben un aumento de la masa ósea, aunque el hueso recién formado mostró evidencias de desorganización (Kamiya, 2008, J. Bone Miner. Res. 23: 2007-2017; Kamiya, 2008 Development 135: 3801-3811). Este hallazgo está en sorprendente contraste con la eficacia de BMP2 y BMP7 (ligandos para ALK3) como agentes de formación de los huesos en el uso clínico.

55 Como se ha demostrado en el presente documento, un polipéptido de ALK3 soluble (ALK3-Fc), que muestra preferencia sustancial en la unión a BMP2 y BMP4, es eficaz para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea in vivo. Aunque no se desea estar ligado a ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de ALK3 esté causado principalmente por un efecto antagonista de BMP, dada la muy fuerte unión de BMP2 y BMP4 (constante de disociación picomolar) exhibida por el constructo ALK3 soluble particular utilizado en estos estudios. Independientemente del mecanismo, es evidente a partir de los datos presentados en el presente documento que

los antagonistas de BMP-ALK3 hacen aumentar la densidad ósea en ratones normales. Sorprendentemente, el hueso generado por el tratamiento con ALK3-Fc no muestra evidencia del tipo de la desorganización observada en los ratones con genes desactivados condicionales de ALK3. Cabe señalar que el hueso es un tejido dinámico, con un crecimiento o contracción y una densidad que aumenta o disminuye en función de un equilibrio de los factores que producen el hueso y estimulan la mineralización (principalmente los osteoblastos) y los factores que destruyen y desmineralizan el hueso (osteoclastos principalmente). El crecimiento óseo y la mineralización se pueden aumentar mediante el aumento de los factores productivos, por la disminución de los factores destructivos, o ambos. Las expresiones "promover el crecimiento del hueso" y "aumentar la mineralización de los huesos" se refieren a los cambios físicos observables en los huesos y se pretende que sean neutrales en cuanto al mecanismo por el cual los cambios en el hueso ocurren.

El modelo de ratón para el crecimiento óseo/densidad que se utilizó en los estudios descritos en el presente documento se considera que es altamente predictivo de la eficacia en seres humanos y, por lo tanto, los polipéptidos de ALK3 y otros antagonistas de BMP-ALK3 pueden usarse para promover el crecimiento óseo y el aumento de la densidad ósea en seres humanos. De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, los antagonistas de BMP-ALK3 para dicho uso incluyen ciertos polipéptidos de ALK3 solubles que se unen a BMP, anticuerpos que se unen a BMP e interrumpen la unión a ALK3 y anticuerpos que se unen a ALK3 e interrumpen la unión a BMP. También se describen para dicho uso proteínas no de anticuerpos seleccionadas para la unión de BMP o ALK3 (véanse, por ejemplo, los documentos WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, los documentos de EE.UU. 2003/0133939 y 2005/0238646 para ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y la selección de los mismos), péptidos aleatorizados seleccionados para la unión de BMP o ALK3, a menudo fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a BMP o ALK3, especialmente aglutinantes de BMP que bloquean los sitios de unión del tipo I (por ejemplo, un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, pueden ser unidos entre sí para crear una molécula de unión bifuncional. También se contemplan aptámeros de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiban el eje de señalización de BMP-ALK3. Adicionalmente, se pueden utilizar, como antagonistas de BMP-ALK3, ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, siARN o ribozimas que inhiben BMP o, particularmente, la expresión de ALK3.

Los términos y las expresiones utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se utiliza cada término. Ciertos términos se discuten a continuación o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional para el profesional en la descripción de las composiciones de la invención y de cómo prepararlos y usarlos. El alcance o el significado de cualquier uso de un término serán evidentes a partir del contexto específico en el que se utilice el término.

"Aproximadamente" significa generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Típicamente, los grados ilustrativos de error están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10% y más preferiblemente dentro del 5% de un valor dado o intervalo de valores.

Alternativamente y, particularmente en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en este documento son aproximadas, a no ser que se indique lo contrario, lo que significa que el término "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indique expresamente.

Las secuencias pueden ser comparadas entre sí, incluyendo la secuencia de tipo salvaje con respecto a uno o más mutantes (variantes de secuencia). Estas comparaciones comprenden típicamente alineamientos de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas y/o algoritmos de alineación de secuencias que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o eliminación de restos, la alineación de secuencias introducirá una "hueco" (normalmente representado por un guión, o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el resto insertado o eliminado.

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

La expresión "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

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

## 2. Polipéptidos de ALK3

Se describen en este documento polipéptidos de ALK3. Tal como se utiliza en este documento, el término "ALK3" se refiere a una familia de proteínas de quinasa-3 tipo receptor de activina (ALK3) [también conocido como receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo IA (BMPR1A), o receptor de activina A, quinasa tipo II (ACVRLK)] de todas las especies y variantes derivadas de dichas proteínas ALK3 por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ALK3 en el presente documento se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ALK3 son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con la actividad serina/treonina quinasa predicha.

La expresión "polipéptido de ALK3" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ALK3, así como las variantes de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos de ALK3 incluyen los polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ALK3 conocido que tiene una secuencia de al menos aproximadamente 80% idéntica respecto a la secuencia de un polipéptido de ALK3 y preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido de ALK3 puede unirse e inhibir la función de una proteína ALK3 y/o BMP. Preferiblemente, un polipéptido de ALK3 promueve el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Los ejemplos de polipéptidos de ALK3 incluyen el polipéptido precursor de ALK3 humano (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos de ALK3 humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 ó 41).

La secuencia de la proteína precursora ALK3 humana (SEQ ID NO: 1) se muestra en la Figura 1, y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína precursora ALK3 humana (SEQ ID NO: 2; nucleótidos 549-2144 de entrada de GenBank NM\_004329) se muestra en la Figura 2. El ALK3 humana soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesada (SEQ ID NO: 3) se muestra en la Figura 3, y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio extracelular de ALK3 humano (SEQ ID NO: 4; los nucleótidos 618-1004 de la entrada de Genbank NM\_004329) se muestra en la Figura 4.

Se describen en este documento polipéptidos solubles de ALK3. Como se describe en el presente documento, la expresión "polipéptido de ALK3 soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ALK3. La expresión "polipéptido de ALK3 soluble", como se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ALK3, así como cualesquiera variantes de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ALK3 que se une a BMP es uno que retiene la capacidad de unirse a los BMP, especialmente BMP2 y BMP4. Preferiblemente, un polipéptido ALK3 que se une a BMP se unirá a BMP con una constante de disociación de 1 nM o menos. La secuencia de aminoácidos de la proteína precursora ALK3 humana se proporciona en la Figura 1. El dominio extracelular de una proteína ALK3 se une a BMP y generalmente es soluble y, por lo tanto, puede ser denominado un polipéptido soluble ALK3 que se une a BMP. Los ejemplos de polipéptidos solubles ALK3 que se unen a BMP incluyen el polipéptido soluble ilustrado en las SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 ó 41. La SEQ ID NO: 7 es de acuerdo con el primer aspecto de la invención, se refiere como ALK3(24-152)-hFc, y se describe adicionalmente en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos solubles ALK3 que se unen a BMP comprenden una secuencia de señal, además del dominio extracelular de una proteína ALK3, por ejemplo, la secuencia líder ALK3 nativa (SEQ ID NO: 8), el líder del activador de plasminógeno tisular (TPA) (SEQ ID NO: 9) o el líder de melitina de la miel de abeja (SEQ ID NO: 10). El polipéptido de ALK3-hFc que se ilustra en la SEQ ID NO: 11 utiliza un líder TPA.

Los fragmentos funcionalmente activos de los polipéptidos de ALK3 se pueden obtener mediante el cribado de polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ALK3. Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como la química Merrifield en fase sólida convencional f-Moc o t-Boc. Los fragmentos pueden ser producidos (de forma recombinante o por síntesis química) y probados para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ALK3 o de señalización mediada por los BMP.

Se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos de ALK3 mediante el cribado de bibliotecas de polipéptidos modificados producidos de forma recombinante a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido de ALK3. Las variantes pueden ser producidas y probadas para identificar a las que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ALK3 o la señalización mediada por los BMP. De acuerdo con el sexto aspecto de la invención, la variante funcional comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 95%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 ó 41.

Las variantes funcionales pueden ser generadas mediante la modificación de la estructura de un polipéptido de ALK3 para fines tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, semivida ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Tales polipéptidos de ALK3 modificados, cuando se seleccionan para retener la unión de BMP, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos de ALK3 de origen natural.

También pueden ser producidos polipéptidos de ALK3 modificados, por ejemplo, por sustitución de aminoácidos, delección o adición. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservativas) no tendrá ningún efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Cuando un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ALK3 da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente mediante la evaluación de la capacidad del polipéptido variante ALK3 para producir una respuesta en células de una manera similar al polipéptido de ALK3 de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos de ALK3 para alterar la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones pueden ser seleccionadas a fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación unidos a O o N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina comprenden generalmente una secuencia de tripéptido, asparagina-X-treonina (o asparaginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por enzimas de glicosilación celulares apropiadas. La alteración también puede hacerse mediante la adición de o sustitución por uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido de ALK3 de tipo salvaje (para sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones primera o tercera de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glicosilación en la secuencia del tripéptido modificado. Otro medio para aumentar el número de grupos carbohidrato en un polipéptido de ALK3 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido de ALK3. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el(los) azúcar(s) puede(n) estar unido(s) a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306. La eliminación de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido de ALK3 podría conseguirse química y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de ALK3 al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en el corte de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La desglicosilación química se describe adicionalmente en Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 y en Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.* 118: 131. El corte enzimático de grupos carbohidrato en los polipéptidos de ALK3 se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas como se describe en Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 138: 350. La secuencia de un polipéptido de ALK3 se puede ajustar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, como células de mamífero, de levadura, de insectos y de plantas, que pueden todos introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden ser afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ALK3 para su uso en seres humanos se expresan en una línea de células de mamíferos que proporciona la glicosilación adecuada, tales como las líneas celulares HEK293 o CHO, si bien, se espera que otras líneas celulares de expresión de mamíferos, líneas de células de levadura con enzimas de glicosilación modificadas y células de insectos sean útiles también.

Se describe en este documento un método de generación de mutantes, en particular los conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido de ALK3, así como mutantes de truncamiento; grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El propósito de la detección de tales bibliotecas combinatorias puede ser la de generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ALK3 que puedan actuar tanto como agonistas o como antagonistas, o alternativamente, que posean actividades novedosas completamente. Una variedad de ensayos de cribado se proporcionan a continuación, y tales ensayos se pueden usar para evaluar variantes. Por ejemplo, puede ser seleccionada una variante de polipéptido de ALK3 por su capacidad de unirse a un ligando de ALK3, para evitar la unión de un ligando de ALK3 a un polipéptido de ALK3 o para interferir con la señalización provocada por un ligando de ALK3.

La actividad de un polipéptido de ALK3 o sus variantes también se puede probar en un ensayo in vivo o basado en células. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido de ALK3 en la expresión de los genes implicados en la producción de hueso o en la destrucción ósea. Esto puede, según sea necesario, llevarse a cabo en presencia de una o más proteínas recombinantes de ligando de ALK3 (por ejemplo, BMP2 o BMP4), y las células se pueden transfectar con el fin de producir un polipéptido de ALK3 y/o variantes de los mismos y, opcionalmente, un ligando de ALK3. Del mismo modo, se puede administrar un polipéptido de ALK3 a un ratón u otro animal, y puede ser evaluada una o más propiedades de los huesos, tales como la densidad o el volumen. La tasa de curación de fracturas óseas también puede ser evaluada. La absorciometría dual de rayos X (DEXA) es una técnica cuantitativa bien establecida no invasiva para la evaluación de la densidad ósea en un animal. En los seres humanos, pueden ser usados sistemas de DEXA centrales para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores predictores de la densidad ósea global. Pueden ser usados sistemas DEXA periféricos para evaluar la densidad ósea en los huesos periféricos, incluyendo, por ejemplo, los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Se pueden usar sistemas de imagen de rayos x tradicionales, incluyendo las

exploraciones CAT, para evaluar el crecimiento óseo y la curación de fracturas. La resistencia mecánica del hueso también puede ser evaluada.

Pueden ser generadas variantes derivadas de forma combinatoria que tengan una mayor potencia selectiva o general en relación con un polipéptido de origen natural ALK3. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan semividas intracelulares drásticamente diferentes que las correspondientes a un polipéptido de ALK3 de tipo salvaje. Por ejemplo, se puede generar la proteína alterada ya sea más estable o menos estable respecto a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que den lugar a la destrucción o la inactivación de un polipéptido de ALK3 nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido de ALK3 mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos de ALK3. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles del polipéptido de ALK3 recombinante dentro del paciente. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden hacer en el enlazador (si existe) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que incluya cada uno al menos una parte de las posibles secuencias de polipéptidos de ALK3. Por ejemplo, puede unirse enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes tal que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido de ALK3 sea expresable como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación en fagos).

Hay muchas maneras por las cuales la biblioteca de homólogos potenciales se puede generar a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede llevarse a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos entonces pueden ser ligados dentro de un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakura et al, (1981) *Recombinant DNA*, Proc. 3rd Cleveland Sympos. *Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al, (1984), *Science* 198: 1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477). Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al, (1990) *Science* 249: 386-390; Roberts et al, (1992) *PNAS USA* 89: 2429-2433; Devlin et al, (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al, (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; así como las patentes de EE.UU. Nos: 5.223.409, 5.198.346, y 5.096.815).

Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar variantes de polipéptidos de ALK3 y aislarlos de una biblioteca mediante selección usando, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina y similares (Ruf et al, (1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572; Wang et al, (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 3095-3099; Balint et al, (1993) *Gene* 137: 109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2888-2892; Lowman et al, (1991) *Biochemistry* 30: 10832-10838; y Cunningham et al, (1989) *Science* 244: 1081-1085), por mutagénesis de barrido de enlazador (Gustin et al, (1993.) *Virology* 193: 653-660; Brown et al, (1992) *Mol. Cell Biol.* 12: 2644-2652; McKnight et al, (1982) *Science* 232: 316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al, (1986) *Science* 232: 613); por mutagénesis por PCR (Leung et al, (1989) *Method Cell Mol Biol* 1: 11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992), *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7: 32-34). La mutagénesis de barrido de enlazador, en particular en un entorno combinatorio, es un método atractivo para la identificación de formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos de ALK3.

Una amplia gama de técnicas son conocidas en la técnica para seleccionar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones de punto y truncamientos y, para el caso, para el cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una cierta propiedad. Tales técnicas serán en general adaptables para la selección rápida de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos de ALK3. Las técnicas más ampliamente utilizadas para la selección de bibliotecas de genes grandes comprende típicamente la clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el relativamente fácil aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a BMP y ensayos de señalización celular mediada por BMP.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de ALK3 de la invención pueden comprender, además, modificaciones post-traduccionales en adición a cualquiera que estén presentes naturalmente en los polipéptidos de ALK3. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de ALK3 modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o mono-sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos en la funcionalidad de un polipéptido de ALK3 pueden ensayarse como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptidos de ALK3. Cuando un polipéptido de ALK3 se produce en células por escisión de una forma naciente del polipéptido de ALK3, el procesamiento después de la traducción también puede ser importante para el plegamiento correcto y/o la función de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y

mecanismos característicos para tales actividades posteriores a la traducción y pueden ser elegidos para asegurar la correcta modificación y el procesamiento de los polipéptidos de ALK3.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o las formas modificadas de los polipéptidos de ALK3 incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ALK3 y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humano. Un dominio de fusión puede seleccionarse a fin de conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el propósito de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas de conjugados de glutatión, amilasa y de níquel o cobalto. Muchos de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión a fin de facilitar la detección de los polipéptidos de ALK3. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como "marcadores de epítipo", que son generalmente secuencias de péptidos cortos para las que un anticuerpo específico está disponible. Los marcadores de epítipo bien conocidos por los que los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina del virus influenza (HA) y marcadores de c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tales como para el Factor Xa o la trombina, lo que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo liberar las proteínas recombinantes de los mismos. Las proteínas liberadas se pueden aislar entonces a partir del dominio de fusión de la separación cromatográfica subsiguiente. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido de ALK3 se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido de ALK3 in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumenta la semivida en suero, independientemente de si esto es debido a la menor destrucción, la disminución del aclaramiento por el riñón u otro efecto farmacocinético. Son conocidas fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina para conferir propiedades farmacocinéticas deseables en una amplia gama de proteínas. Del mismo modo, las fusiones a albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden ser seleccionadas incluyen la multimerización de dominios (por ejemplo, la dimerización, la tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como una mayor estimulación del crecimiento del hueso o del crecimiento muscular, según se desee).

Como un ejemplo específico, una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ALK3 fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 en la Figura 5). Ejemplos de dominios Fc se muestran a continuación:

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAK  
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK\*

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en los restos, tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asp-265) tiene reducida la capacidad de unión al receptor de Fc $\gamma$  con respecto a un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene incrementada la capacidad de unirse al receptor de Fc relacionado con el CMH clase I (FcRn) a un dominio Fc de tipo salvaje.

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer en cualquier forma que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, puede colocarse C-terminal un polipéptido de ALK3 a un dominio heterólogo, o, alternativamente, puede ser colocado C-terminal un dominio heterólogo a un polipéptido de ALK3. El dominio del polipéptido de ALK3 y el dominio heterólogo no tienen que ser adyacentes en una proteína de fusión y se pueden incluir extremos C- o N-terminal a dominios adicionales o secuencias de aminoácidos a cualquiera del dominio o entre los dominios.

Los polipéptidos de ALK3 de la presente invención pueden contener una o más modificaciones que sean capaces de estabilizar los polipéptidos de ALK3. Por ejemplo, tales modificaciones aumentan la semivida in vitro de los polipéptidos de ALK3, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos de ALK3 o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de ALK3. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de ALK3 y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de ALK3) y modificaciones del resto de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidratos a partir de un polipéptido de ALK3). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido de ALK3 está fusionado a un dominio de estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un

dominio Fc). Tal como se utiliza en este documento, la expresión "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de hidrato de carbono, o polímero no proteico, tales como polietilenglicol.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención hace disponibles las formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de ALK3, que se aíslan de, o de otro modo, sustancialmente libres de otras proteínas. Los polipéptidos de ALK3 se producirán generalmente por la expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

### 3. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de ALK3

10 Se describen en este documento ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos de ALK3 (por ejemplo, polipéptidos de ALK3 solubles), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en este documento. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 codifica el polipéptido precursor de ALK3 humano de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 4 codifica el dominio extracelular procesado de ALK3. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden utilizarse, por ejemplo, en los métodos para la fabricación de polipéptidos de ALK3 o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).  
15

Los ácidos nucleicos en cuestión que codifican polipéptidos de ALK3 se entienden además que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 2 ó 4. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o eliminaciones, tales como variantes alélicas.

20 El segundo aspecto de la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia codificante para el polipéptido del primer aspecto. Este puede comprender el ácido nucleico de SEQ. ID NO: 12. El polipéptido del sexto aspecto puede estar codificado por un polinucleótido aislado o recombinante que comprenda una secuencia de ácidos nucleicos que sea al menos 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37. Cualquier experto ordinario en la técnica apreciará que secuencias de ácido nucleico complementarias a las SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37 y las variantes de las SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37 están también dentro del alcance de esta invención. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.  
25

30 En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas con la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37, secuencia complementaria de SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37, o fragmentos de los mismos. Como se discutió anteriormente, cualquier experto normal en la técnica entenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promuevan la hibridación de ADN. Cualquier experto ordinario en la técnica entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN se pueden variar. Por ejemplo, se podría llevar a cabo la hibridación en 6,0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de la sal en la etapa de lavado se puede seleccionar a partir de una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden ser variadas, o la temperatura o la concentración de la sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de astringencia bajas de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.  
35  
40

45 Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos que se exponen en SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37, debido a la degeneración en el código genético, también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, se designan un número de aminoácidos por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión entre las células de mamíferos. Cualquier experto en la técnica apreciará que pueden existir estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína en particular entre los individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualesquiera y todas tales variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta invención.  
50

55 En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas son conocidos en la técnica para una variedad de células huésped. Típicamente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de

inicio de la transcripción y terminación, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica se contemplan por la invención. Los promotores pueden ser tanto promotores de origen natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede ser insertada en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable que permite la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

En ciertos aspectos de la invención, el ácido nucleico objeto se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ALK3 y que se une operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de ALK3. En consecuencia, la expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos del control de la expresión. Secuencias reguladoras ilustrativas se describen en Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se unen operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ALK3. Tales secuencias de control de la expresión útiles, incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7, cuya expresión está dirigida por la T7 ARN polimerasa, las principales regiones operadora y promotora del fago lambda, las regiones de control para la proteína de la cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de  $\alpha$ -apareamiento de levadura, el promotor poliédrico del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína que se desee expresar. Por otra parte, el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores de antibióticos, también deben ser considerados.

Un ácido nucleico recombinante de la invención puede producirse mediante la ligación del gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, aviar, insecto o mamífero), o ambos. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido recombinante ALK3 incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como E. coli.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en bacterias, y una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de la resistencia a fármacos en células tanto procariotas como eucariotas. Alternativamente, pueden usarse derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o virus de Epstein-Barr (pHEBo, pREP-derivado y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales) se pueden encontrar a continuación en la descripción de sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3ª Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUWI) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene  $\beta$ -gal).

En una realización preferida, se diseñó un vector para la producción de los polipéptidos objeto de ALK3 en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores de pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-Neo (Promega, Madison, Wise). Como será evidente, pueden usarse los constructos de genes objeto para causar la expresión de los polipéptidos objeto de ALK3 en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

Esta invención también se refiere a una célula huésped transfectada con un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 12, 15, 21, 24, 27, 32 ó 37). La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ALK3 de la invención puede expresarse en células bacterianas tales como E. coli, células de insecto (por ejemplo, utilizando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

De acuerdo con ello, se describen en este documento métodos de producción de los polipéptidos objeto de ALK3. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ALK3 puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido de ALK3. El polipéptido de ALK3 puede ser secretado y aislado a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de ALK3. Alternativamente, el polipéptido de ALK3 puede ser retenido citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células recogidas, ser lisadas y aisladas de la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos objeto de ALK3 pueden aislarse a partir del medio del 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, purificación por inmovilización con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de ALK3 y la purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido de ALK3 (por ejemplo, una columna de proteína A se puede utilizar para purificar una fusión ALK3-Fc). En una realización preferida, el polipéptido de ALK3 es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. La purificación se puede conseguir mediante una serie de etapas de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio de cationes. La purificación se pudo completar con la filtración vírica y el intercambio de tampón. Como se ha demostrado en el presente documento, la proteína ALK3-hFc se purificó a una pureza de >98%, determinada por cromatografía de exclusión por tamaño y > 95% según se determinó mediante SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables en el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como un secuencia del sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido de ALK3 recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni<sup>2+</sup>. La secuencia líder de purificación después puede retirarse posteriormente por tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido de ALK3 purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; y Janknecht et al, *PNAS USA* 88: 8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados de composición para la ligación, la digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable y la ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden hibridarse posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons: 1992).

#### 4. Antagonistas de BMP y ALK3 alternativos

Los datos presentados en el presente documento demuestran que los antagonistas de la señalización de BMP-ALK3 se pueden utilizar para promover el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Aunque los polipéptidos de ALK3 solubles y, en particular ALK3-Fc, son antagonistas preferidos, y aunque tales antagonistas pueden afectar el hueso a través de un mecanismo distinto del antagonismo de BMP (por ejemplo, la inhibición de BMP puede ser un indicador de la tendencia de un agente para inhibir las actividades de un espectro de moléculas, incluyendo, quizás, otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y tal inhibición colectiva puede dar lugar al efecto deseado sobre el hueso), se esperan que otros tipos de antagonistas de BMP-ALK3 sean útiles, incluyendo anticuerpos anti-BMP (por ejemplo, BMP2 o BMP4), anticuerpos anti-ALK3, antisentido, ARNi o ácidos nucleicos de ribozima que inhiben la producción de ALK3, BMP2 o BMP4 y otros inhibidores de BMP o ALK3, particularmente aquellos que interrumpen la unión de BMP-ALK3.

Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido de ALK3 (por ejemplo, un polipéptido soluble de ALK3), y que o bien se une competitivamente a ligando con el polipéptido de ALK3 o de otro modo inhibe la señalización mediada por ALK3, puede ser usado como un antagonista de las actividades de polipéptidos de ALK3. Del mismo modo, se puede utilizar un anticuerpo que sea específicamente reactivo con un polipéptido BMP y que interrumpa la unión del polipéptido de ALK3, como un antagonista.

Mediante el uso de inmunógenos derivados de un polipéptido de ALK3 o un polipéptido de BMP, antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo puede ser inmunizado con una forma inmunogénica del polipéptido de ALK3, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación con vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Una porción inmunogénica de un polipéptido BMP o ALK3 puede ser administrada en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede controlarse por detección de títulos

de anticuerpos en plasma o suero. El ELISA estándar u otros inmunoensayos pueden usarse con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido de ALK3, se pueden obtener los antisuecos y, si se desea, los anticuerpos policlonales pueden ser aislados a partir del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden cultivar células productoras de anticuerpos (los linfocitos) a partir de un animal inmunizado y fusionarlas por procedimientos de fusión de células somáticas estándar con células de inmortalización tales como células de mieloma para producir células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar et al, (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células de hibridoma se pueden seleccionar inmunquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de ALK3 y los anticuerpos monoclonales aislarse a partir de un cultivo que comprenda tales células de hibridoma.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, pretende incluir fragmentos del mismo que también sean específicamente reactivos con un polipéptido objeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos ser seleccionados para la utilidad de la misma manera que la descrita anteriormente para los anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmento F(ab)<sub>2</sub> tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo útil en la presente invención se pretende que incluya además moléculas biespecíficas y humanizadas y completamente humanas quiméricas de una sola cadena que tienen afinidad por un polipéptido BMP o ALK3 conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede comprender además un marcador fijado al mismo y capaz de ser detectado (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o co-factor de enzima).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante, término que abarca cualquier anticuerpo generado en parte por técnicas de biología molecular, incluyendo los anticuerpos injertados con CDR o quiméricos, anticuerpos humanos o de otros ensamblados a partir de dominios de anticuerpos seleccionados de la biblioteca, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos de dominio simple (por ejemplo, proteínas VH humanas o proteínas de camélidos V<sub>HH</sub>). En ciertas realizaciones, un anticuerpo útil de la invención es un anticuerpo monoclonal. Se describen en este documento métodos para la generación de nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de ALK3 o polipéptido de BMP puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de antígeno eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obteniendo células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células de bazo) del ratón y fusionando de las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y probando los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma puede ser propagado en un cultivo de células, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo celular.

El adjetivo "específicamente reactivo con", tal como se utiliza en referencia a un anticuerpo, se entiende que significa, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido de ALK3) y otros antígenos que no son de interés que el anticuerpo sea útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) para discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y polipéptidos que reaccionan cruzados. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con una gama de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> o menos. Teniendo en cuenta la unión extraordinariamente estrecha entre los BMP y ALK3, se espera que una neutralización del anticuerpo anti-BMP o anti-ALK3 tendría generalmente una constante de disociación de 10<sup>-9</sup> o menos.

Además, las técnicas utilizadas para detectar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable puede influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se va a utilizar para la unión de un antígeno en solución, puede ser deseable analizar la solución de unión. Una variedad de técnicas diferentes están disponibles para el ensayo de la interacción entre los anticuerpos y los antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, el ensayo de unión de Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

Ejemplos de categorías de compuestos de ácidos nucleicos que son antagonistas de BMP o ALK3 incluyen ácidos nucleicos antisentido, las construcciones de RNAi y construcciones de ácido nucleico catalíticos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto de doble cadena también puede incluir regiones de voladizo o de no complementariedad, en donde uno o el otro de los hilos es de cadena sencilla. Un compuesto de una sola hebra puede incluir regiones de auto-complementariedad, lo que significa que el compuesto forma una denominada "horquilla" o estructura "tallo-bucle", con una región de estructura de doble hélice. Un compuesto de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a una región que consiste en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 30, 25, 22, 20 ó 18 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ALK3 de longitud completa o la secuencia de ácidos nucleicos de BMP. La región de complementariedad será preferiblemente de al menos 8 nucleótidos, y, opcionalmente, de al menos 10 o al menos 15 nucleótidos, y opcionalmente entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede caer dentro de un intrón, una secuencia de codificación o una secuencia no codificante de la transcripción de la diana, tal como la porción de la secuencia de codificación. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y, opcionalmente, la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (en particular para su uso como un antisentido), ARN o híbrido ARN:ADN. Cualquier hebra puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden ser fácilmente clasificadas como ADN o ARN. Del mismo modo, un compuesto de doble cadena puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN, y cualquiera de las cadenas también pueden incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden ser fácilmente clasificadas como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, incluyendo una o más modificaciones a la estructura principal (la porción de azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo enlaces internucleotídicos) o la porción de base (la porción de purina o de pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico antisentido tendrá preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y, a menudo contiene una o más modificaciones para mejorar características, tales como la estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar donde sea probable que sea entregado el compuesto, tal como el estómago en el caso de compuestos suministrados por vía oral y el pulmón para los compuestos inhalados. En el caso de una construcción de RNAi, la hebra complementaria a la transcripción de la diana será generalmente ARN o modificaciones de los mismos. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción dúplex de la construcción de RNAi de "horquilla" de doble cadena o de cadena sencilla tendrá preferiblemente una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y, opcionalmente, de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, con tal de que sirva como sustrato Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y pueden contener también formas modificadas. Los compuestos de ácido nucleico puede inhibir la expresión de la diana en aproximadamente 50%, 75%, 90% o más cuando entra en contacto con las células en condiciones fisiológicas y a una concentración donde un control sin sentido o sentido tienen poco o ningún efecto. Las concentraciones preferidas para probar el efecto de compuestos de ácidos nucleicos son 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácido nucleico también se pueden ensayar por sus efectos sobre, por ejemplo, el crecimiento óseo y la mineralización.

#### 5. Ensayos de cribado

Los polipéptidos de ALK3 (por ejemplo, los polipéptidos de ALK3 solubles) y los polipéptidos de BMP pueden usarse para identificar compuestos (agentes) que sean agonistas o antagonistas de la vía de señalización de BMP-ALK3. Los compuestos identificados a través de esta selección pueden analizarse para evaluar su capacidad para modular el crecimiento óseo o la mineralización in vitro. Opcionalmente, estos compuestos pueden ser probados en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido in vivo.

Existen numerosos métodos para la detección de agentes terapéuticos para modular el crecimiento del tejido por el reconocimiento de polipéptidos de BMP y ALK3. Puede llevarse a cabo detección de alto rendimiento de compuestos para identificar los agentes que perturban los efectos mediados por BMP o ALK3 sobre el hueso. El ensayo se lleva a cabo para detectar e identificar a los compuestos que inhiben específicamente o reducen la unión de un polipéptido de ALK3 a los BMP. Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que potencien la unión de un polipéptido de ALK3 a los BMP. Los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con un polipéptido de BMP o ALK3.

Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente descripción, aquellos que no se describen expresamente en este documento serán, sin embargo, comprendidos por cualquier experto normal en la técnica. Como se describe en el presente documento, los compuestos de ensayo (agentes) de la invención pueden ser creados por cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) para ser probados por su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento de tejidos se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), se pueden producir químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos) o se pueden producir de forma recombinante. Los compuestos de ensayo incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de ensayo es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 daltons.

Los compuestos de ensayo de la invención se pueden proporcionar como entidades individuales y discretas, o se proporcionan en bibliotecas de mayor complejidad, tales como las hechas por química combinatoria. 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 ensayo al sistema de ensayo puede ser, ya sea en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de detección iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden ser derivatizados opcionalmente con otros compuestos y tienen grupos derivatizantes que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de los grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes de entrecruzamiento fotoactivables o cualquiera de sus combinaciones.

En muchos programas de selección de fármacos que analizan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento a fin de maximizar el número de compuestos estudiados en un determinado periodo de tiempo. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como lo que pueden ser derivados con proteínas purificadas o semi-purificadas, son a menudo preferidos como pantallas "primarias" porque pueden ser generados para permitir el rápido desarrollo y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Por otra parte, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de ensayo pueden ser generalmente ignorados en el sistema *in vitro*, el ensayo en lugar de ser centrado principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido de ALK3 y los BMP.

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de selección ejemplar, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido de ALK3 aislado y purificado que es normalmente capaz de unirse a los BMP. A la mezcla del compuesto y al polipéptido de ALK3, a continuación, se añade una composición que contiene un ligando de ALK3. La detección y cuantificación de complejos de ALK3/BMP proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido de ALK3 y los BMP. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a dosis a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade un BMP aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido de ALK3, y la formación del complejo de ALK3/BMP se cuantifica en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos puede variarse, y se pueden mezclar de forma simultánea. Por otra parte, en lugar de proteínas purificadas, pueden ser utilizados extractos celulares y lisados para poner un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación de complejos entre el polipéptido de ALK3 y los BMP puede ser detectada por una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable tales como polipéptido de ALK3 radiomarcado (por ejemplo, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>3</sup>H), marcado con fluorescencia (por ejemplo, FITC) o polipéptido de ALK3 marcado enzimáticamente o los BMP, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

Se pueden usar ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, ya sea directa o indirectamente, del grado de interacción entre un polipéptido de ALK3 y su proteína de unión. Además, pueden ser usados otros modos de detección, tales como los basados en guías de onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y la patente de EE.UU. N° 5.677.196), resonancia de plasmón de superficie (SPR), sensores de carga de superficie y sensores de resistencia de superficie.

Además, puede usarse un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido de ALK3 y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.283.317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72: 223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14: 920-924; e Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8: 1693-1696). Pueden usarse sistemas de dos híbridos inversos para identificar a los compuestos (por ejemplo, pequeñas moléculas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido de ALK3 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 EE.UU. Nos. 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

Los presentes compuestos se pueden identificar por su capacidad de interactuar con un polipéptido de ALK3 o BMP de la invención. La interacción entre el compuesto y del polipéptido de ALK3 o BMP puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción puede ser identificada al nivel de proteínas utilizando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo foto-reticulación, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al, 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden ser examinados en un ensayo basado en el mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de BMP o ALK3. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido de BMP o ALK3 se puede transfectar con un sistema indicador (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, o la proteína verde fluorescente) en una célula y cribarlo frente a la biblioteca de preferencia mediante un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en el mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de

unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, perla o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resueltos por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse generalmente mediante métodos colorimétricos o fluorescencia o resonancia de plasmón de superficie.

5 Se describen en este documento métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación de hueso y aumentar la masa ósea. Por lo tanto, puede ser probado cualquier compuesto identificado en células completas o tejidos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento del hueso o la mineralización. Diversos métodos conocidos en la técnica pueden ser utilizados para este propósito.

10 Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos de ALK3 o BMP o los compuestos de ensayo sobre el hueso o el crecimiento de cartílago puede ser determinado mediante la medición de la inducción de Msx2 o la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos basados en células (véase, por ejemplo, Daluiski et al., Nat Genet., 2001, 27 (1): 84-8; Hino et al, Front Biosci. 2004, 9: 1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye el análisis de la actividad osteogénica de los polipéptidos de ALK3 o BMP objeto y compuestos de ensayo en células progenitoras mesenquimales y osteoblásticas. Para ilustrarlo, se pueden construir adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido de BMP o ALK3 para infectar células C3H10T1/2 pluripotentes progenitoras mesenquimales, células C2C12 preosteoblásticas y células osteoblásticas TE-85. La actividad osteogénica se determina a continuación mediante la medición de la inducción de la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y la mineralización de la matriz (véase, por ejemplo, Cheng et al, J Bone Joint Surg Am 2003, 85-A (8): 1544-1552).

20 Pueden usarse ensayos in vivo para medir el crecimiento de hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al, Bone, 28: 80-86 (2001) describen un modelo de rata osteoporótica en el que se estudia la reparación ósea durante el período inicial después de la fractura. Kubo et al, Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68: 197-202 (1999) describen también un modelo de rata osteoporótica en el que se estudia la reparación ósea durante el último período después de la fractura. Andersson et al., J. Endocrinol. 170: 529-537 describen un modelo de osteoporosis en ratón en el que los ratones son ovariectomizadas, lo que hace que los ratones pierdan el contenido mineral óseo sustancial y la densidad mineral ósea, perdiendo el hueso trabecular más o menos el 50% de la densidad mineral ósea. La densidad ósea se podría aumentar en los ratones ovariectomizados mediante la administración de factores tales como la hormona paratiroidea. Pueden usarse ensayos de curación de fracturas que son conocidos en la técnica. Estos ensayos incluyen la técnica de fractura, el análisis histológico y el análisis biomecánico, que se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 6.521.750, que describe protocolos experimentales para causar fracturas así como la medición de la extensión de las fracturas y su proceso de reparación.

## 30 6. Usos terapéuticos ejemplares

En el cuarto aspecto de la invención, se pueden usar ciertos antagonistas de BMP-ALK3 (por ejemplo, polipéptidos de ALK3) para tratar o prevenir una enfermedad o afección que está asociada con el daño óseo, ya sea, por ejemplo, a través de la rotura, la pérdida o la desmineralización. El daño en el hueso puede tratarse o prevenirse en un individuo en necesidad del mismo a través de la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de BMP-ALK3, particularmente un polipéptido de ALK3. Dado el potencial para un efecto dual sobre la resorción ósea y la formación, tales compuestos pueden ser útiles en una amplia gama de enfermedades que se tratan actualmente con anabólicos (por ejemplo, la hormona paratiroidea y derivados de los mismos) o agentes anti-resorción (por ejemplo, bisfosfonatos). Se describen en este documento métodos para promover el crecimiento óseo o la mineralización en un individuo en necesidad del mismo a través de la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de BMP-ALK3, particularmente un polipéptido de ALK3. Estos métodos están dirigidos opcionalmente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales y, más preferiblemente, de seres humanos. La descripción proporciona el uso de antagonistas de BMP-ALK3 (polipéptidos de ALK3 particularmente solubles y anticuerpos neutralizantes dirigidos a los BMP o ALK3) para el tratamiento de trastornos asociados con baja densidad ósea o la disminución de la resistencia ósea.

45 Como se usa en este documento, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición de la enfermedad o condición en la muestra tratada con respecto a una muestra de control sin tratar, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o condición en relación con la muestra de control sin tratar. El término "tratar", como se usa en este documento, incluye la profilaxis de la dolencia nombrada o la mejora o la eliminación una vez que se ha establecido. En cualquier caso, pueden distinguirse la prevención o el tratamiento en el diagnóstico proporcionado por un médico y el resultado deseado de la administración del agente terapéutico.

55 La descripción proporciona métodos de la inducción de la formación de hueso y/o cartílago, evitando la pérdida de hueso, el aumento de la mineralización ósea o la prevención de la desmineralización del hueso. Por ejemplo, los antagonistas de BMP-ALK3 objeto tienen aplicación en el tratamiento de los trastornos de pérdida ósea, tales como osteoporosis y la curación de fracturas óseas y defectos del cartílago u otros defectos de los huesos, lesiones y trastornos en seres humanos y otros animales. Los polipéptidos de ALK3 o BMP pueden ser útiles en pacientes que se diagnostican con una baja densidad ósea subclínica, como medida de protección contra el desarrollo de la osteoporosis.

Las composiciones de la presente invención pueden encontrar utilidad médica en la curación de fracturas óseas y defectos del cartílago en seres humanos y otros animales. Los métodos y las composiciones también pueden tener uso profiláctico en cerrado, así como la reducción de fracturas abiertas y también en la mejor fijación de las articulaciones artificiales. La formación de hueso de novo inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumas o inducidos por resección oncológica y también es útil en cirugía plástica cosmética. En ciertos casos, los antagonistas de BMP-ALK3 objeto pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de las células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Los antagonistas de BMP-ALK3 de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de la osteoporosis.

Rosen et al. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7<sup>a</sup> ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D. C. ofrece una extensa discusión de trastornos óseos que pueden ser objeto de tratamiento con antagonistas de BMP-ALK3. Una lista parcial se proporciona en el presente documento. Las composiciones de la invención se pueden aplicar a afecciones caracterizadas o que causan la pérdida de masa ósea, tales como osteoporosis (incluyendo osteoporosis secundaria), hiperparatiroidismo, trastorno mineral y óseo asociado a la enfermedad renal, privación de hormonas sexuales o ablación (por ejemplo, andrógenos y/o estrógenos), tratamiento con glucocorticoides, artritis reumatoide, quemaduras graves, hiperparatiroidismo, hipercalcemia, hipocalcemia, hipofosfatemia, osteomalacia (incluyendo osteomalacia inducida por tumor), hiperfosfatemia, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo (incluyendo hiperparatiroidismo familiar) y pseudohipoparatiroidismo, metástasis tumorales al hueso, pérdida de hueso como consecuencia de un tumor o de la quimioterapia, tumores de los huesos y de la médula ósea (por ejemplo, mieloma múltiple), trastornos de los huesos isquémicos, enfermedad periodontal y pérdida ósea oral, enfermedad de Cushing, enfermedad de Paget, tirotoxicosis, estado de diarrea crónica o malabsorción, acidosis tubular renal o anorexia nerviosa. Las composiciones de la invención también pueden aplicarse a condiciones caracterizadas por un fallo de la formación del hueso o la curación, incluyendo fracturas no consolidadas, fracturas que son de otro modo lentas de sanar, displasias óseas fetales y neonatales (por ejemplo, hipocalcemia, hipercalcemia, defectos del receptor de calcio y la deficiencia de vitamina D), osteonecrosis (incluyendo osteonecrosis de la mandíbula) y osteogénesis imperfecta. Además, los efectos anabólicos causarán que tales antagonistas disminuyan el dolor óseo asociado con daños en los huesos o erosión. Como consecuencia de los efectos anti-resorción, tales antagonistas pueden ser útiles para tratar trastornos de la formación ósea anormal, tales como metástasis tumorales osteoblásticas (por ejemplo, asociadas con el cáncer de próstata primario o de mama), osteosarcoma osteogénico, osteopetrosis, displasia diafisaria progresiva, hiperostosis endoósea, osteopoiquilia y melorreostosis. Otros trastornos que pueden tratarse incluyen la displasia fibrosa y las condrodisplasias.

Además de la discusión anterior, las personas que tengan cualquiera de los siguientes perfiles pueden ser candidatas para el tratamiento con un antagonista de ALK3: una mujer post-menopáusica y que no toma estrógenos u otra terapia de reemplazo hormonal; una persona con un historial personal o materno de fractura de cadera o fumadora; una mujer post-menopáusica que sea alta (más de 5 pies y 7 pulgadas (170,18 centímetros)) o delgada (menos de 125 libras (56,70 kg)); un hombre con enfermedades clínicas asociadas a la pérdida de masa ósea; una persona que utiliza medicamentos que se sabe que causan la pérdida de hueso, incluyendo los corticosteroides, tales como la Prednisona™, varios medicamentos anticonvulsivos como el Dilantin™ y determinados barbitúricos, o drogas de reemplazo de la tiroides en dosis elevadas; una persona que tiene diabetes tipo 1, enfermedad hepática, enfermedad renal, una historia familiar de osteoporosis; una persona que tiene un alto recambio óseo (por ejemplo, un exceso de colágeno en las muestras de orina); una persona con una enfermedad de la tiroides, tal como el hipertiroidismo; una persona que ha sufrido una fractura después de un traumatismo leve único; una persona que ha tenido pruebas de rayos x de fractura vertebral u otros signos de osteoporosis.

La osteoporosis (que significa, en términos generales, un estado de baja densidad ósea o resistencia) puede estar causada o es asociada a varios factores. Ser mujer, especialmente una mujer posmenopáusica, que tiene un peso corporal bajo y un estilo de vida sedentario son factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea, dando lugar a riesgo de fractura).

La osteoporosis también puede resultar como una condición asociada a otro trastorno o por la utilización de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante de drogas o alguna otra condición médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una condición conocida como la enfermedad de Cushing, la cantidad en exceso de cortisol producida por el cuerpo resulta en osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados con 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 se necesitan niveles adecuados de hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroides) 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 de masa ósea cuando se toman en dosis altas por personas con problemas renales, en particular los sometidos a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen la fenitoína (Dilantin) y los barbitúricos que se utilizan para prevenir las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, folex PFS), un medicamento para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos del sistema inmune; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un fármaco utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para deprimir el sistema inmune en pacientes con trasplante de órganos; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), que se utiliza para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparina, Liquaemin), un medicamento

anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), que se utiliza para tratar el colesterol alto. La pérdida ósea resultante de la terapia del cáncer es ampliamente reconocida y se denomina pérdida ósea inducida por terapia del cáncer (CTIBL). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden ser corregidas por el tratamiento con antagonistas de BMP-ALK3.

5 Opcionalmente, los antagonistas de BMP-ALK3, particularmente un ALK3 soluble, descrito en este documento, pueden usarse en pacientes con cáncer. Los pacientes que tienen ciertos tumores (por ejemplo, de próstata, de mama, mieloma múltiple o cualquier tumor que cause hiperparatiroidismo) están en alto riesgo de pérdida ósea debido a la pérdida ósea inducida por los tumores, así como las metástasis óseas y agentes terapéuticos. Estos  
10 pacientes pueden ser tratados con antagonistas de BMP-ALK3 incluso en ausencia de evidencias de pérdida de hueso o metástasis óseas. Los pacientes también pueden ser monitorizados para detectar evidencias de pérdida de hueso o metástasis óseas, y pueden ser tratados con antagonistas de BMP-ALK3 en el caso de que los indicadores sugieran un aumento del riesgo. En general, se emplean las exploraciones DEXA para evaluar los cambios en la densidad ósea, mientras que se pueden usar indicadores de la remodelación ósea para evaluar la probabilidad de metástasis óseas. Los marcadores séricos pueden ser monitoreados. La fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP) es una enzima que está presente en los osteoblastos. Los niveles sanguíneos de BSAP se incrementan en  
15 pacientes con metástasis en los huesos y otras condiciones que resultan en un aumento de la remodelación ósea. La osteocalcina y los péptidos de procolágeno también están asociados con la formación de hueso y las metástasis óseas. Se han detectado aumentos en BSAP en pacientes con metástasis ósea causada por cáncer de próstata y, en menor grado, en las metástasis óseas del cáncer de mama. Los niveles de proteína morfogenética ósea-7 (BMP-7) son elevados en el cáncer de próstata que ha hecho metástasis al hueso, pero no en las metástasis de hueso debidas al cáncer de vejiga, piel, hígado o pulmón. El telopéptido carboxi-terminal tipo I (CIFT) es un agente de reticulación que se encuentra en el colágeno y que se forma durante la resorción del hueso. Dado que el hueso está siendo constantemente descompuesto y reformado, el ICTP se encuentra en todo el cuerpo. Sin embargo, en el sitio de la metástasis ósea, el nivel será significativamente mayor que en un área de hueso normal. El ICTP se ha  
25 encontrado en niveles altos en la metástasis ósea debida al cáncer de próstata, de pulmón y mama. Otro agente de reticulación del colágeno, el telopéptido N-terminal Tipo I (NTx), se produce junto con el ICTP durante el recambio óseo. La cantidad de NTx se incrementa en la metástasis ósea causada por muchos tipos diferentes de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, de próstata y de mama. Además, los niveles de NTx aumentan con la progresión de la metástasis ósea. Por lo tanto, este marcador se puede usar para detectar tanto la metástasis, como para medir la extensión de la enfermedad. Otros marcadores de resorción incluyen piridinolina y desoxipiridinolina. Cualquier aumento en los marcadores de resorción o marcadores de metástasis en los huesos indican la necesidad de una terapia con antagonistas de BMP-ALK3 en un paciente.

Se pueden utilizar antagonistas de BMP-ALK3 en pacientes con un trastorno mineral y óseo asociado a la enfermedad renal (CKD-MBD), un amplio síndrome de trastornos metabólicos esquelético, cardiovascular y minerales interrelacionados derivados de la enfermedad renal. El CKD-MBD abarca diversas patologías esqueléticas a menudo y se refiere como osteodistrofia renal (ROD), que es preferida para el tratamiento con antagonistas de  
35 BMP-ALK3. En función de la contribución relativa de los diferentes factores patógenos, la ROD se manifiesta como diversos patrones patológicos de remodelado óseo (Hruska et al., 2008, Chronic kidney disease mineral bone disorder (CKD-MBD); en Rosen et al (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7<sup>a</sup> ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C., pp. 343-349). En un extremo del espectro se encuentra ROD con osteodistrofia urémica y bajo recambio óseo, que se caracteriza por un bajo número de sitios activos de remodelación, una formación de hueso profundamente reprimida y una resorción ósea baja. En el otro extremo se encuentra ROD con hiperparatiroidismo, alto recambio óseo y osteítis fibrosa. Dado que los antagonistas de BMP-ALK3 ejercen tanto efectos anabólicos como antirresortivos, estos agentes pueden ser  
45 útiles en pacientes en todo el espectro de la patología ROD.

Se pueden administrar antagonistas de BMP-ALK3 conjuntamente con otros agentes farmacéuticos. La administración conjunta puede llevarse a cabo mediante la administración de una única co-formulación, mediante la administración simultánea o por administración en momentos separados. Los antagonistas de BMP-ALK3 pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros agentes activos para los huesos. Un paciente puede beneficiarse de recibir conjuntamente el antagonista de BMP-ALK3 y tomando suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio apropiado y/o, en algunos casos, otra medicación. Los ejemplos de otros medicamentos incluyen bifosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos y raloxifeno afectan al ciclo de remodelación ósea y se clasifican como medicamentos anti-resorción. El remodelado óseo consiste en dos etapas distintas: la resorción ósea y la formación ósea. Los medicamentos antirresortivos ralentizan o detienen la porción de resorción ósea del ciclo de remodelación ósea pero no retardan la porción de formación de hueso del ciclo. Como resultado, la nueva formación continúa a una velocidad mayor que la resorción ósea y la densidad ósea puede aumentar con el tiempo. La teriparatida, una forma de la hormona paratiroidea, aumenta la tasa de formación del hueso en el ciclo de remodelación ósea. El alendronato está aprobado tanto para la prevención (5 mg por día o 35  
50 mg una vez a la semana) y el tratamiento (10 mg por día o 70 mg una vez a la semana) de la osteoporosis postmenopáusica. El alendronato reduce la pérdida de masa ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral, muñeca y cadera. El alendronato también está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres, como resultado de un uso a largo plazo de estos  
60

medicamentos (es decir, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de la osteoporosis en los hombres. El alendronato y la vitamina D están aprobados para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (70 mg una vez a la semana más vitamina D), y para el tratamiento para mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis. El ibandronato está aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Tomado como una pastilla una vez al mes (150 mg), el ibandronato se debe tomar en el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. El Risedronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Tomado diariamente (5 mg de dosis) o semanal (dosis de 35 mg o 35 mg de dosis con calcio), el risedronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna vertebral y no vertebrales. El Risedronato también está aprobado para su uso por hombres y mujeres para prevenir y/o tratar la osteoporosis inducida por glucocorticoides que resulta del uso a largo plazo de estos medicamentos (es decir, la prednisona o la cortisona). La calcitonina es una hormona natural implicada en la regulación del calcio y el metabolismo óseo. En las mujeres que llevan más de 5 años después de la menopausia, la calcitonina reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea de la columna, y puede aliviar el dolor asociado con las fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de fracturas de la columna. La calcitonina está disponible en forma de inyección (50-100 UI al día) o aerosol nasal (200 UI al día). La terapia con estrógeno (TE)/terapia hormonal (TH) está aprobada para la prevención de la osteoporosis. La TE se ha demostrado que reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea en la columna y la cadera, y reduce el riesgo de fracturas de cadera y vertebrales en mujeres posmenopáusicas. La TE se administra más comúnmente en la forma de una píldora o un parche cutáneo que proporciona una dosis baja de aproximadamente 0,3 mg al día o una dosis estándar de aproximadamente 0,625 mg al día y es eficaz incluso cuando se inicia después de los 70 años de edad. Cuando los estrógenos se toman solos, se puede aumentar el riesgo en las mujeres de desarrollar cáncer del revestimiento uterino (cáncer de endometrio). Para eliminar este riesgo, los profesionales médicos prescriben la hormona progestina en combinación con estrógenos (terapia de reemplazo hormonal o TH) para aquellas mujeres que tienen un útero intacto. La TE/TH alivia los síntomas de la menopausia y se ha demostrado que tiene un efecto beneficioso sobre la salud de los huesos. Los efectos secundarios pueden incluir sangrado vaginal, sensibilidad en los senos, cambios de humor y enfermedad de la vesícula biliar. El raloxifeno, 60 mg al día, está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Es a partir de una clase de medicamentos llamados moduladores selectivos del receptor estrogénico (SERM) que se han desarrollado para proporcionar efectos beneficiosos de los estrógenos sin sus desventajas potenciales. El raloxifeno aumenta la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. No hay datos todavía disponibles para demostrar que el raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras no vertebrales. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y hombres que están en alto riesgo de sufrir una fractura. Este medicamento estimula la formación de hueso nuevo y aumenta significativamente la densidad mineral ósea. En las mujeres posmenopáusicas, se observó reducción de las fracturas en la columna vertebral, la cadera, los pies, las costillas y la muñeca. En los hombres, se observó reducción de las fracturas en la columna vertebral, pero no había datos suficientes para evaluar la reducción de fracturas en otros sitios. La teriparatida se administra como una autoinyección diaria durante un máximo de 24 meses.

#### 7. Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas de BMP-ALK3 (por ejemplo, polipéptidos de ALK3) pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido de ALK3 solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto se pueden formular para su administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

La composición puede administrarse sistémicamente o localmente, como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención está, por supuesto, en una forma libre de pirógenos y fisiológicamente aceptable. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de ALK3 que pueden también opcionalmente estar incluidos en la composición como se describe anteriormente, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con los compuestos en cuestión (por ejemplo, los polipéptidos de ALK3) en los métodos de la invención.

Típicamente, los antagonistas de ALK3 serán administrados parenteralmente. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos de ALK3 en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas y estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de usar, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para la entrega a un sitio de tejido diana (por ejemplo, el hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, los polipéptidos de ALK3) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, el hueso), proporcionando una estructura para el desarrollo del tejido y óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar la liberación lenta de los polipéptidos de ALK3. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, los aspectos cosméticos y las propiedades de la interfaz. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirán la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y químicamente definidas por sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, ácido poliláctico y polianhídridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como el colágeno óseo o dérmico. Otras matrices están compuestas de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos antes mencionados de material, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos pueden alterarse en su composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o 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 lavados bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como el ingrediente activo. El agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

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

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

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

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

Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico asistente considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la invención (por ejemplo, los polipéptidos de ALK3). Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, la cantidad de peso del hueso que se desea formar, el grado de la pérdida de densidad ósea, el sitio del daño del hueso, el estado del hueso dañado, la edad del paciente, el sexo y la dieta, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a la pérdida ósea, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz 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 monitorizarse mediante la evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación del hueso, por ejemplo, los rayos X (incluyendo DEXA), determinaciones histomorfométricas y el marcaje de tetraciclina.

Puede usarse terapia génica para la producción in vivo de los polipéptidos de ALK3. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de los polinucleótidos de ALK3 en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La administración de las secuencias de los polinucleótidos de ALK3 se puede lograr utilizando un vector de expresión recombinante, tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere, para la administración terapéutica de las secuencias de polinucleótidos de ALK3, el uso de liposomas dirigidos.

Varios vectores víricos que pueden utilizarse para la terapia génica como se enseña en este documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia, 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 un solo gen ajeno se puede insertar incluyen, pero no están limitados a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Una serie de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que las células transducidas puedan ser identificadas y generadas. Los vectores retrovirales pueden hacerse dirigidos específicamente uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La diana preferida se logra usando un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unirse a una envuelta viral para permitir la administración específica de la diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido de ALK3. El vector está dirigido al hueso o al cartílago.

Alternativamente, pueden ser directamente transfectadas células de cultivo de tejidos con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectaron entonces con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para polinucleótidos de ALK3 es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro in vitro e in vivo. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia de genes eficiente usando un vehículo de liposoma, son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, et al, Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente el colesterol. También se pueden utilizar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la resistencia iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El reconocimiento de liposomas también es posible en base a, por ejemplo, la especificidad del órgano, la especificidad de la célula y la especificidad del orgánulo y se conoce en la técnica.

#### Ejemplificación

La invención se describe ahora en general; se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente para fines de ilustración de ciertas realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

#### Ejemplo 1. Generación de proteínas de fusión de ALK3-Fc

La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos correspondiente para el ALK3 humano nativo se muestran en las figuras 1 y 2. Los solicitantes diseñaron una proteína de fusión de ALK3-hFc en la que el dominio extracelular (restos 24-152) del ALK3 humano (Figuras 3 y 4) se fusionan a través del extremo C-terminal con un dominio Fc humano (Figuras 5 y 6) a través de un enlazador mínimo (compuesto de los restos de aminoácidos TGGG) para producir la proteína que se muestra en la Figura 7. Se consideraron las siguientes tres secuencias líder:

(i) Nativa: MPQLYIYIRLLGAYLFIISRVQG (SEQ ID NO: 8)

(ii) Activador de plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

(iii) Melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMWYISYIYA (SEQ ID NO: 10)

5 La forma seleccionada de hALK3(24-152)-hFc (SEQ ID NO: 11) emplea el líder TPA y tiene la secuencia de aminoácidos sin procesar que se muestra en la Figura 8. Una secuencia de nucleótidos sentido que codifica esta proteína de fusión y la secuencia antisentido correspondiente se indican en la Figura 9. A continuación se muestra una secuencia de nucleótidos sentido alternativa que codifica hALK3(24-152)-hFc, que incorpora una sustitución C → T en la posición 1137 (subrayado) que no altera la secuencia de aminoácidos.

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
41  TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCCAGAATCT
81  GGATAGTATG CTTCATGGCA CTGGGATGAA ATCAGACTCC
121 GACCAGAAAA AGTCAGAAAA TGGAGTAACC TTAGCACCAG
161 AGGATACCTT GCCTTTTTTTA AAGTGCTATT GCTCAGGGCA
201 CTGTCCAGAT GATGCTATTA ATAACACATG CATAACTAAT
241 GGACATTGCT TTGCCATCAT AGAAGAAGAT GACCAGGGAG
281 AAACCACATT AGCTTCAGGG TGTATGAAAT ATGAAGGATC
321 TGATTTTCAG TGCAAAGATT CTCCAAAAGC CCAGCTACGC
361 CGGACAATAG AATGTTGTCG GACCAATTTA TGTAACCAGT
401 ATTTGCAACC CACACTGCCC CCTGTTGTCA TAGGTCCGTT
441 TTTTGATGGC AGCATTGCGA CCGGTGGTGG AACTCACACA
481 TGCCACCCTG GCCCAGCACC TGAATCCTG GGGGGACCCT
521 CAGTCTTCCT CTCCCCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT
561 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
601 GTGAGCCACG AAGACCCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG
641 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG
681 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
721 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT
761 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT
801 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
841 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA
881 CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT
921 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
961 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG
1001 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT
1041 GGACAAGAGC AAGTGGCAGC AGGGGAACGT CTCTCATGC
1081 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA
10  1121 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAATGA

```

15 Una variante de hALK3(24-152)-Fc con el líder TPA y con Fc murina sustituida para Fc humana se muestra en la Figura 10. Una secuencia de nucleótidos sentido que codifica esta variante y su secuencia antisentido correspondiente se indican en la Figura 11. Los solicitantes construyeron una forma de hALK3(24-152)-mFc que tiene una asparagina en la posición 71 (posición 70 en la secuencia nativa ALK3 ECD). La proteína se expresó en líneas de células CHO y la secuencia N-terminal reveló una especie primaria con un bloque N-terminal, lo que indica un comienzo en el resto de la glutamina (Q) nativa, en consonancia con la proteína de SEQ ID NO: 7, y una única

secuencia menor de GAQNLD SMLHGTGMK (SEQ ID NO: 17). Los solicitantes, además, construyeron una proteína de hALK3(24-152)-hFc que tiene la secuencia de ALK3 nativa. Otra variante de ALK3-Fc que comprende el dominio extracelular de ALK3 murino (restos 24-152 nativos en el precursor murino) y el dominio Fc murino se generó por métodos similares. La secuencia de aminoácidos de esta variante, mALK3 (24-152)-mFc, se muestra a continuación con el dominio ALK3 subrayado:

5  
1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGAQNLD SM LHGTGMKSDL DQKKPENGVT  
51 LAPEDTL PFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCF AII EED DQGETTLTSG  
101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCR TNL CNQYLQPTLP P VVIGPFFDG  
151 SIRTGGGEPR VPITQNPCPP LKECPPCAAP DLLGGPSVFI FPPKIKDVL M  
201 ISLSPMVTCV VVDVSEDDPD VQISWVNNV EVHTAQ TQTH REDYNSTLRV  
251 VSALPIQH QD WMSGKEFKCK VNNRALPSPI EKTISKPRGP VRAPQVYVLP  
301 PPAEEMTKKE FSLTCMITGF LPAEIAVDWT SNGRTEQNYK NTATVLDSDG  
351 SYFMYSKLRV QKSTWERGSL FACS VVHEGL HNHLTTKTIS RSLGK

(SEQ ID NO: 18)

Ejemplo 2. Unión del ligando a ALK3-Fc

10 Se utilizó la metodología Biacore™ para determinar la afinidad de unión de las proteínas de fusión de Fc-ALK3 para más de 15 miembros de la familia BMP/GDF. El mALK3-mFc derivado de células HEK 293 muestran la unión a hBMP2 y hBMP4 de alta afinidad ( $K_D = 2,43 \times 10^{-9}$  y  $9,47 \times 10^{-10}$ , respectivamente), así como la unión de afinidad moderada a varios otros ligandos, incluyendo hBMP6 y hBMP7. El hALK3(24-152)-hFc muestra un perfil de unión similar. Específicamente, el hALK3(24-152)-hFc derivado de células HEK 293 unidas a hBMP2 y hBMP4 con  $K_D$  de  $6,53 \times 10^{-10}$  y  $1,02 \times 10^{-9}$ , respectivamente, mientras que el hALK3(24-152)-hFc derivado de células CHO unido a hBMP2 y hBMP4 con  $K_D$  de  $4,53 \times 10^{-10}$  y  $7,03 \times 10^{-10}$ , respectivamente. Al igual que mALK3(24-152)-mFc, los hALK3(24-152)-hFc derivados de ambos tipos de células mostraron una moderada afinidad de unión a hBMP6 y hBMP7, entre otros ligandos.

20 La selectividad global de ALK3-Fc para BMP2 y BMP4 es notable. Aunque no se desea estar ligado a ningún mecanismo particular, los solicitantes plantean la hipótesis, sobre la base de estos resultados, de que ALK3-Fc ejerce sus efectos in vivo principalmente por la unión de BMP2 y BMP4 y, por lo tanto, inhibiendo la señalización por estos ligandos. En consecuencia, se prevé que los anticuerpos contra BMP2 y/o BMP4 también estimulen la formación ósea. Alternativamente, se espera que un anticuerpo contra el dominio de unión del ligando de ALK3 inhiba la señalización mediada por ALK3 de manera más amplia. La Figura 18 muestra esquemáticamente ejemplos de tres enfoques propuestos en este documento que interfieren con la señalización por BMP2 y BMP4, y ligandos potencialmente adicionales con el fin de promover la formación de hueso.

30 Una serie de proteínas ALK3-Fc que incorporan variantes truncadas del dominio extracelular de ALK3 humano (ECD) se generaron y se compararon con hALK3(24-152)-hFc por sus afinidades de unión de ligando. Las variantes de ALK3 ECD con deleciones N-terminales de 6, 12, 27 ó 31 aminoácidos, las deleciones C-terminales de 6 ó 12 aminoácidos, y un doble truncamiento se expresaron en células HEK 293 y se purificaron por cromatografía de Mab (columna de Proteína A). La metodología Biacore™ se utilizó para seleccionar los miembros de la superfamilia del ligando BMP/GDF/TGFβ para la unión a estas variantes.

Afinidad de unión ( $K_D$ , en pM) de Ligandos Humanos Seleccionados para Variantes de ALK3 ECD Humanas					
Constructo Expresado en Células 293		Ligando			
		hBMP2	hBMP4	hBMP6	hBMP7
Cadena Completa	hALK3(24-152)-hFc	653	1020	17300	5990
ALK3NΔ6	hALK3(30-152)-hFc	869	1610	12800	--
ALK3NΔ12	hALK3(36-152)-hFc	1040	--	5280	--
ALK3NΔ27	hALK3(51-152)-hFc	1570	--	8040	4290

Afinidad de unión ( $K_D$ , en pM) de Ligandos Humanos Seleccionados para Variantes de ALK3 ECD Humanas					
Constructo Expresado en Células 293		Ligando			
		hBMP2	hBMP4	hBMP6	hBMP7
ALK3NΔ31	hALK3(55-152)-hFc	663	--	17000	3670
ALK3CΔ6	hALK3(24-146)-hFc	532	396	--	--
ALK3CΔ12	hALK3(24-140)-hFc	769	446	--	5900
ALK3NΔ6CΔ6	hALK3(30-146)-hFc	437	329	--	--
-- unión no detectable					

Como puede observarse, los truncamientos C-terminales que se evaluaron muestran una afinidad de unión similar o mayor por BMP2/BMP4 en comparación con ALK3 ECD de cadena completa, con una reducción general de la unión a BMP6/BMP-7, aunque ALK3CΔ12 conserva la unión a BMP-7 a una afinidad similar a los ALK3 ECD de cadena completa. Por el contrario, los truncamientos N-terminales tienden a reducir la unión a BMP2, abolir la unión a BMP4 y muestran varios efectos sobre la unión a BMP6/BMP7. Curiosamente, las variantes de ALK3NΔ6CΔ6 doblemente truncadas muestran mayor afinidad por BMP2/BMP4 en comparación con los ALK3 ECD de longitud completa, en combinación con la unión indetectable a BMP6/BMP7. Las moléculas con mayor selectividad para los objetivos deseados, BMP2 y BMP4, son útiles porque tendrán menos efectos "fuera del objetivo" en los pacientes. La secuenciación del extremo N-terminal mostró que el ácido nucleico que codifica un truncamiento de seis aminoácidos en el extremo N-terminal, cuando se expresa en un cultivo celular, daba lugar a una población de polipéptidos que tienen el truncamiento de seis aminoácidos y una población de polipéptidos que tienen un truncamiento de siete aminoácidos. Tomados en conjunto, estos demuestran que los polipéptidos de hALK3-HFC que contienen hasta un truncamiento de siete aminoácidos en el extremo N-terminal y hasta un truncamiento de doce aminoácidos en el extremo C-terminal conservan una actividad útil y demuestran la reducción deseable y sorprendente en la unión a ligandos fuera de la diana. Por lo tanto, se puede usar un polipéptido de ALK3 que comprende al menos los aminoácidos de 8 a 117 de SEQ ID NO: 3 para los fines descritos en el presente documento.

Las propiedades de unión a ligandos se utilizaron para comparar la calidad de la proteína hALK3(24-152)-hFc derivada de células CHO con las derivadas de células HEK 293. Según lo determinado por la metodología Biacore™, la afinidad ( $K_D$ ) de BMP2 para hALK3(24-152)-hFc no difirió dependiendo de la fuente de la proteína de fusión; sin embargo, el porcentaje de proteína activa generada por las células CHO fue más alta que la de las células HEK 293 en función de sus respectivos valores  $R_{max}$ .  $R_{max}$  es una medida de la calidad de la proteína igual a  $(PM_A/PM_L) \times R_L \times S_M$ , donde  $PM_A$  es el peso molecular del analito,  $PM_L$  es el peso molecular del ligando,  $R_L$  es el nivel de inmovilización en unidades de respuesta, y  $S_M$  es la estequiometría molar. El análisis correspondiente de la unión de BMP4 reveló que la proteína derivada de células CHO exhibía una mayor afinidad por BMP4 que la que exhibía de las células HEK 293 ( $K_D$  de 314 pM vs. 1020 pM, respectivamente) y el valor de  $R_{max}$  para la proteína generada por las células CHO fue tres veces la de la proteína a partir de células HEK 293, lo que indica de nuevo un porcentaje más alto de proteína activa. Por lo tanto, los beneficios inesperados de las células CHO como la fuente de la proteína hALK3(24-152)-hFc incluyen una mayor afinidad de unión de la proteína a BMP4 y una mayor biodisponibilidad predicha para dar como resultado una calidad más alta de la proteína (valor  $R_{max}$ ).

### Ejemplo 3. hALK3-mFc mejora el estado óseo en ratones

Los solicitantes investigaron la capacidad de una versión de ALK3-MFC para mejorar el estado de los huesos en ratones. Fueron tratados ratones hembra C57BL/6 de doce semanas de edad ( $n = 8$  por grupo) con hALK3(24-152)-mFc, 10 mg/kg, o vehículo (solución salina tamponada con Tris) por inyección intraperitoneal dos veces por semana para un total de seis semanas. En comparación con el vehículo, hALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente la densidad ósea de todo el cuerpo, según lo determinado por absorciometría de energía dual de rayos X (DEXA), el día 31 y se mantuvo este efecto a través de la finalización del estudio en el día 42 (Figura 12). Un efecto similar del tratamiento de hALK3(24-152)-mFc en la densidad ósea se observó para el análisis localizado de vértebras lumbares por DEXA en estos mismos puntos de tiempo (Figura 13). Además, las mediciones de alta resolución de la diáfisis tibial y la tibia proximal se llevaron a cabo mediante tomografía micro-computerizada (micro-CT) para determinar el efecto de hALK3(24-152)-mFc sobre el hueso cortical y el hueso trabecular, respectivamente. En comparación con el vehículo, el tratamiento de hALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente: i) el espesor del

hueso cortical en la semana 6 (Figura 14), ii) el volumen del hueso trabecular en la Semana 4 (Figura 15) e iii) el espesor trabecular medio en la semana 4 (Figura 16). Las reconstrucciones representativas tridimensionales de las secciones generadas por micro-CT a través de la tibia proximal (Figura 17) ponen de relieve el efecto estimulador robusto del tratamiento con hALK(24-152)-mFc (4 semanas) en la microarquitectura trabecular del hueso. Es importante destacar que el tratamiento con hALK(24-152)-mFc no provocó cambios significativos en la masa magra del tejido, masa de grasa o la masa de glóbulos rojos en el transcurso del estudio.

Tomados en conjunto, los datos anteriores demuestran que se puede usar hALK3(24-152)-mFc in vivo para mejorar selectivamente el estado óseo a través del aumento de la densidad mineral ósea y el aumento de la formación neta de tanto el hueso cortical como el trabecular.

#### 10 Ejemplo 4. hALK3-mFc aumenta la resistencia ósea en ratones

En el experimento descrito en el Ejemplo 3, los solicitantes también investigaron la capacidad de hALK3(24-152)-mFc para aumentar la resistencia de los huesos. Después de 6 semanas de tratamiento, se recogieron los fémures y se almacenaron congelados a -20°C. Los huesos fueron luego descongelados a temperatura ambiente y se realizaron ensayos de flexión de cuatro puntos destructivos en la diáfisis del fémur izquierdo con un instrumento de ensayo mecánico Instron (Instron 4465 retro-equipado a 5500). La separación entre los soportes fijos fue 7 mm y la separación entre los dos puntos de aplicación de la carga fue de 2,5 mm. Se aplicó la carga a una velocidad de desplazamiento constante de 3 mm/min hasta la rotura del hueso y los datos de carga máxima, rigidez y absorción de energía se calcularon con el software Bluehill v 2.5. En comparación con el vehículo, hALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente la carga ósea máxima en un 30% (Figura 19), la rigidez del hueso en un 14% (Figura 20) y la energía al fallo del hueso en un 32% (Figura 21). Estos hallazgos demuestran que el aumento de la resistencia ósea acompaña la mejora de la composición ósea observada con el tratamiento de hALK3(24-152)-mFc (Ejemplo 3).

#### Ejemplo 5. Efectos de mALK3-mFc en hueso en un modelo de ratón OVX de osteopenia

La deficiencia de estrógenos en las mujeres posmenopáusicas promueve la pérdida ósea, en particular la pérdida de hueso trabecular. Por lo tanto, los solicitantes investigaron la capacidad de mALK3(24-152)-mFc para mejorar el estado del hueso en un modelo de ratón ovariectomizado (OVX) de osteopenia con pérdida ósea establecida. Se sometieron ratones hembra C57BL/6 de ocho semanas de edad a OVX bilateral o cirugía simulada, a continuación, permaneció sin tratar durante un intervalo de ocho semanas. Al final de las ocho semanas, las mediciones de la línea de base por micro-CT y DEXA confirmaron una pérdida ósea significativa en los ratones OVX comparado con el tratamiento simulado. Lo más notable fue una reducción del 43% en el volumen del hueso trabecular (Figura 22, punto de tiempo día 0), como se determina en la tibia proximal mediante micro-CT. Los ratones se trataron luego con mALK3(24-152)-mFc, 10 mg/kg, o vehículo (solución salina tamponada con Tris), por inyección ip dos veces por semana durante 8 semanas.

El tratamiento con mALK3(24-152)-mFc condujo a una mejora tanto en el hueso trabecular como el cortical a pesar de continuar la deficiencia de estrógenos. En la finalización del estudio el día 56, el volumen del hueso trabecular en la tibia proximal de ratones OVX tratados con mALK3(24-152)-mFc se incrementó en casi un 250% comparado con los controles OVX y en más de un 80% en comparación con los controles simulados (Figura 22). El tratamiento con mALK3(24-152)-mFc también causó un crecimiento del hueso cortical, tal como se indica por el aumento del espesor cortical (Figura 23) y la reducción de la circunferencia endósea (Figura 24) en el eje tibial en comparación con los controles OVX. Estas mejoras fueron acompañadas por un aumento de la densidad mineral ósea. En comparación con los controles OVX, el tratamiento con mALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente en todo el cuerpo la densidad mineral ósea (como se determina por DEXA) en el día 14 y se mantuvo esta mejora hasta la finalización del estudio (Figura 25). Efectos similares se observaron con el tratamiento con mALK3(24-152)-mFc sobre la densidad mineral en la columna lumbar (Figura 26) y el fémur-tibia (Figura 27). Las imágenes tri-dimensionales del hueso trabecular vertebral derivadas del análisis de micro-CT (Figura 28) ponen de relieve la robusta mejora en el estado óseo asociado con el tratamiento con mALK3(24-152)-mFc, a pesar de la deficiencia de estrógenos en curso. Estos hallazgos demuestran que mALK3(24-152)-mFc puede revertir el deterioro de hueso, incluyendo el hueso trabecular, asociado con la retirada de estrógenos en un modelo de ratón de la osteopenia. La capacidad de mALK3(24-152)-mFc para transformar el hueso de una condición de osteopenia a uno que sobrepase la cantidad (Figuras 22-24, 28) y que coincida con la calidad (Figuras 25-27) de los huesos en los controles de gónadas intactas es una evidencia de que este agente ejerce efectos que no sólo son antirresortivos sino anabólicos.

#### Ejemplo 6. Efectos de mALK3-mFc sobre la histomorfometría ósea y biomarcadores en suero en ratones

En un estudio separado, los solicitantes investigaron la capacidad de mALK3-MFC para mejorar el estado del hueso en ratones según la evaluación de la histomorfometría y de los biomarcadores en suero. Fueron tratados ratones C57BL/6 hembra de doce semanas de edad con mALK3(24-152)-mFc, 10 mg/kg, o vehículo (solución salina tamponada con Tris) por inyección intraperitoneal dos veces por semana. A las cohortes de ratones se practica la autopsia después de 14, 28 y 42 días de tratamiento para permitir la recogida de hueso y suero. Los compuestos de calceína fluorescente (20 mg/kg) y demeclociclina (20 mg/kg) se administraron por vía intraperitoneal a ratones 9 días y 2 días antes de la necropsia, respectivamente, para el análisis histomorfométrico dinámico.

El hueso fue preparado para la histomorfometría como sigue. En la necropsia, el fémur derecho se separó, y la cuarta parte distal del fémur se sometió a una preparación histológica que consistía en la deshidratación, la infiltración de metacrilato de metilo, y la incrustación en metacrilato de metilo. Un micrótopo rotatorio se utilizó para obtener conjuntos de secciones frontales en espesores de 4 y 8 micras. Las secciones más finas se tiñeron con tricrómico de Goldner y se utilizaron para el análisis de parámetros estáticos, mientras que las secciones más gruesas se montaron sin teñir y se utilizaron para el análisis de los parámetros dinámicos. La histomorfometría se realizó en tratamiento ciego con un microscopio de luz/epifluorescencia Eclipse E4000 de Nikon conectado a un subsistema de vídeo corriente con software de análisis de imágenes OsteoMeasure.

El análisis histomorfométrico del fémur distal reveló tanto efectos anabólicos como antirresortivos de ALK3-Fc. En comparación con el vehículo, mALK3(24-152)-mFc aumentó significativamente el volumen de hueso en los tres puntos de tiempo hasta en un 90% (Figura 29). Es importante destacar que mALK3(24-152)-mFc aumentó la tasa de formación del hueso en tanto como un 120% (Figura 30) y la superficie de mineralización ósea en tanto como un 115% (Figura 31). Estos últimos parámetros son considerados indicativos del crecimiento óseo anabólico, aunque marcadores adicionales de efectos anabólicos – la superficie de los osteoblastos y la superficie de los osteoides – mostraron aumentos más modestos o insignificantes. El análisis histomorfométrico también proporcionó una evidencia de los efectos antirresortivos temporales, como que el mALK3(24-152)-mFc redujo la superficie de los osteoclastos significativamente el día 28 solamente (Figura 32) y se observó un efecto similar sobre la superficie erosionada.

También se investigaron los efectos del tratamiento con mALK3(24-152)-mFc sobre los biomarcadores séricos del estado de los huesos. El RANKL (activador del receptor del ligando del factor- $\kappa$ B nuclear) es producido por los osteoblastos y es un activador clave de la diferenciación de los osteoclastos, mientras que la osteoprotegerina (OPG) es un inhibidor endógeno de la señalización de RANKL. Por lo tanto, la relación RANKL/OPG es un determinante importante de la actividad osteoclástica, la masa ósea y la calidad ósea (Boyce et al, 2008, Arch Biochem Biophys 473: 139-146). En el presente experimento, los niveles séricos de RANKL y OPG se midieron con los productos de Millipore (MBN2A-41K y 41K-MBN-1OPG) que incorporan la tecnología Luminex xMAP®. El tratamiento con mALK3(24-152)-mFc redujo significativamente los niveles de RANKL en suero en los tres puntos de tiempo (Figura 33) y aumentó significativamente los niveles de OPG en suero a los 28 y 42 días (Figura 34) en comparación con el vehículo. Estos resultados indican que el tratamiento con mALK3(24-152)-mFc estimula la formación de hueso, en parte, a través de una acción antirresortiva.

#### Ejemplo 7. Efectos de mALK3-mFc en la expresión génica de esclerostina en ratones

La proteína esclerostina es un regulador negativo clave en la formación del hueso y la interferencia con la señalización de esclerostina se ha publicado que ejerce efectos anabólicos sobre el hueso in vivo (Li et al, 2009, J Bone Miner Res. 24: 578-588). Por lo tanto, los solicitantes investigaron si el tratamiento con mALK3(24-152)-mFc in vivo alteraba la expresión de los genes de esclerostina en el hueso y, por lo tanto, si una reducción en los niveles de esclerostina podría mediar potencialmente algunos de los efectos reconstructivos óseos de ALK3-Fc. Fueron tratados ratones hembra C57BL/6 de doce semanas de edad con mALK3(24-152)-mFc o vehículo (PBS) mediante inyección intraperitoneal dos veces por semana. A las cohortes de ratones se les practicó la autopsia después de 2, 7, 14, y 28 días de tratamiento lo que permitió la recogida bilateral de los fémures y de las tibias, que se separaron y se limpiaron de cualquier tejido de músculo residual o conectivo.

La expresión de genes de esclerostina se analizó como sigue. Los huesos fueron recortados para dejar al descubierto el eje de la médula interior, y las células de la médula se lavaron con solución salina estéril usando una aguja del calibre 21 unida a una jeringa de 3 ml. Los fémures y las tibias de cada ratón fueron pulverizados juntos, y se extrajo el ARN a partir del polvo resultante con un kit RiboPure (Ambion) según las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN en las muestras de hueso se confirmó con nanochips de ARN (Agilent Technologies) pasados en un Bioanalizador 2100 de Agilent Technologies de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se transcribió inversamente usando reactivos TaqMan RT (Applied Biosystems) y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) con la sonda de esclerostina/cebadores y control endógeno de ARNr 18S eucariota (ambos de Applied Biosystems). Las amplificaciones se realizaron con un sistema 7300 de Applied Biosystems, y los resultados fueron analizados utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

En comparación con el vehículo, el tratamiento con mALK3(24-152)-mFc redujo los niveles óseos del ARNm de esclerostina significativamente en tres de los cuatro puntos de tiempo investigados (Figura 35). Este hallazgo indica que la reducción de la expresión de esclerostina puede contribuir a los efectos anabólicos y/o antirresortivos de mALK3(24-152)-mFc sobre el hueso.

#### Ejemplo 8. Efecto de hALK3-hFc en el estado óseo en ratones

Los solicitantes investigaron los efectos de la construcción humana hALK3(24-152)-hFc en el estado óseo en ratones. Fueron tratados ratones hembra C57BL/6 de doce semanas de edad (n = 6 por grupo) con hALK3(24-152)-hFc, 10 mg/kg, o vehículo (solución salina tamponada con Tris) por inyección intraperitoneal dos veces por semana durante una total de 6 semanas. En el transcurso del experimento, el volumen de hueso trabecular disminuyó casi un 20% en los controles tratados con vehículo, pero aumentó en más del 80% con el tratamiento de hALK3(24-152)-

hFc, como se determina por el análisis de micro-CT de la tibia proximal (Figura 36). También se observaron aumentos significativos desde la línea base en el número trabecular (34%) y el espesor trabecular (20%) con hALK3(24-152)-hFc, pero no con el vehículo, por conclusión del estudio. En comparación con el vehículo, hALK3(24-152)-hFc aumentó significativamente en todo el cuerpo la densidad mineral ósea, como se determina por DEXA, en la conclusión del estudio. El análisis localizado de las vértebras lumbares (L1-L6) por DEXA también reveló un efecto significativo de la estimulación (21% de aumento) de hALK3(24-152)-hFc sobre la densidad mineral ósea en la conclusión del estudio en comparación con el vehículo.

Estos resultados muestran que la construcción humana de hALK3(24-152)-hFc puede mejorar el estado del hueso en ratones, aunque se espera que la magnitud de sus efectos en los roedores disminuiría por la respuesta inmune. En conjunto, los resultados anteriores demuestran que las construcciones de ALK3-Fc 1) promueven la formación de hueso, tanto en el esqueleto axial como en el esqueleto apendicular a través de ambas acciones antirresortiva y anabólica, 2) mejoran la resistencia mecánica del hueso, y 3) invierte la pérdida de hueso inducida por la deficiencia de estrógenos en un modelo de ratón de osteopenia establecida.

Ejemplo 9. Ácidos nucleicos de hALK3 HFC ilustrativos y proteínas

Este ejemplo resume construcciones de ácido nucleico usadas para expresar las construcciones de ALK3 en células CHO, de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento, y proporciona las proteínas maduras aisladas a partir del cultivo celular.

A. El ácido nucleico de SEQ ID NO: 19 se expresó en células CHO y se aislaron las siguientes especies ALK3-Fc:

(1) La secuencia de hALK3(24-152)-hFc mostrada en la SEQ ID NO: 7, comenzando con una glutamina (que tiende a ser bloqueada para la secuenciación N-terminal por degradación de Edman).

(2) La secuencia de hALK3(GA, 24-152)-hFc mostrada a continuación (SEQ ID NO: 20), que retiene una alanina-glicina inicial a partir de la secuencia líder.

```
GAQNLDSM LHGTGMKSDS
DQKKESENGVT LAPEDTLPFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN
GHCFAIIEED DQGETTLASG CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR
RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG SIRTGGGHTT
CPPCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
VSHEDPEVKF NMYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
QPENNYKTTT PVLDSDGSEF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK*
(SEQ ID NO:20)
```

B. Un ácido nucleico, que codifica hALK3(24-146)-hFc, se muestra a continuación (SEQ ID NO: 21); se expresó en células CHO:

```
AT GGATGCAATG AAGAGAGGGC
TCTGCTGTGT GCTGCTGCTG TGTGGAGCAG TCTTCGTTTC
GCCCCGGCGCC CAGAATCTGG ATAGTATGCT TCATGGCACT
GGGATGAAAT CAGACTCCGA CCAGAAAAAG TCAGAAAATG
GAGTAACCTT AGCACCAGAG GATACCTTGC CTTTTTTAAA
GTGCTATTGC TCAGGGCACT GTCCAGATGA TGCTATTAAT
```

AACACATGCA TAACTAATGG ACATTGCTTT GCCATCATAG  
 AAGAAGATGA CCAGGGAGAA ACCACATTAG CTCAGGGTG  
 TATGAAATAT GAAGGATCTG ATTTTCAGTG CAAAGATTCT  
 CCAAAAAGCCC AGCTACGCCG GACAATAGAA TGTGTGCGGA  
 CCAATTTATG TAACCAGTAT TTGCAACCCA CACTGCCCCC  
 TGTGTGCATA GGTCCGTTTA CCGGTGGTGG AACTCACACA  
 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGACCGT  
 CAGTCTTCCT CTTCACCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT  
 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG  
 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG  
 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCCTGT GGTGAGCGTC  
 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT  
 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA  
 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA  
 CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT  
 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT  
 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC  
 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA  
 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAATGA

(SEQ ID NO:21)

Se aislaron las siguientes especies de proteína:

- 5 (1) La hALK3(24-146)-hFc se muestra a continuación (SEQ ID NO: 22), comenzando con una glutamina (que tiende a ser bloqueada para la secuenciación N-terminal por degradación de Edman).

QNLD SMLHGT

GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
 NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS  
 PKAQLRRTIE CCRTNLCNQY LQPTLPPVVI GPFTGGGHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNV FSC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO: 22)

- (2) La secuencia de hALK3(GA,24-146)-hFc mostrada a continuación (SEQ ID NO: 23), que retiene una glicina-alanina inicial de la secuencia líder.

ES 2 575 695 T3

GA QNLDSMLHGT

GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS  
PKAQLRRITIE CCRTNLCNQY LQPTLPPVVI GPFTGGGTHT  
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
QPENNYKTPP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:23)

C. Un ácido nucleico, que codifica hALK3(24-140)-hFc, se muestra a continuación (SEQ ID NO: 24); se expresó en células CHO:

ATGG

ATGCAATGAA GAGAGGGCTC TGCTGTGTGC TGCTGCTGTG  
TGGAGCAGTC TTCGTTTCGC CCGGCGCCCA GAATCTGGAT  
AGTATGCTTC ATGGCACTGG GATGAAATCA GACTCCGACC  
AGAAAAAGTC AGAAAATGGA GTAACCTTAG CACCAGAGGA  
TACCTTGCCCT TTTTAAAGT GCTATTGCTC AGGGCACTGT  
CCAGATGATG CTATTAATAA CACATGCATA ACTAATGGAC  
ATTGCTTTGC CATCATAGAA GAAGATGACC AGGGAGAAAC  
CACATTAGCT TCAGGGTGTA TGAAATATGA AGGATCTGAT  
TTTCAGTGCA AAGATTCTCC AAAAGCCCAG CTACGCCGGA  
CAATAGAATG TTGTCGGACC AATTTATGTA ACCAGTATTT  
GCAACCCACA CTGCCCCCTA CCGGTGGTGG AACTCACACA  
TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGGACCGT  
CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCAAGG ACACCCTCAT

GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG  
 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG  
 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT  
 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA  
 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA  
 CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT  
 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT  
 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC  
 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA  
 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGA

(SEQ ID NO:24)

Se aislaron las siguientes especies de proteínas:

(1) La hALK3(24-140)-hFc se muestra a continuación (SEQ ID NO: 25), comenzando con una glutamina (que tiende a ser bloqueada para la secuenciación N-terminal por degradación de Edman.

QNL D

SMLHGTGMKS DSDQKKSENG VTLAPEDTLP FLKCYCSGHC  
 PDDAINNTCI TNGHCFAIIE EDDQGETTLA SGCMKYEGSD  
 FQCKDSPKAQ LRRTIECCRT NLCNQYLQPT LPPTGGGHT  
 CPFCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
 5 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:25)

(2) La secuencia de hALK3(GA,24-140)-hFc mostrada a continuación (SEQ ID NO: 26), que retiene una glicina-alanina inicial de la secuencia líder.

GAQNL D

SMLHGTGMKS DSDQKKSENG VTLAPEDTLP FLKCYCSGHC

PDDAINNTCI TNGHCFIIE EDDQGETTLA SGCMKYEGSD  
 FQCKDSPKAQ LRRTIECCRT NLCNQYLQPT LPPTGGGHT  
 CPFCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:26)

D. Un ácido nucleico que codifica hALK3(30-152)-hFc, mostrado a continuación (SEQ ID NO: 27) se expresó en células CHO:

AT GGATGCAATG AAGAGAGGGC  
 TCTGCTGTGT GCTGCTGCTG TGTGGAGCAG TCTTCGTTTC  
 GCCCGGCGCC CTTTCATGGCA CTGGGATGAA ATCAGACTCC  
 GACCAGAAAA AGTCAGAAAA TGGAGTAACC TTAGCACCAG  
 AGGATACCTT GCCTTTTTTA AAGTGCTATT GCTCAGGGCA  
 CTGTCCAGAT GATGCTATTA ATAACACATG CATAACTAAT  
 GGACATTGCT TTGCCATCAT AGAAGAAGAT GACCAGGGAG  
 AAACCACATT AGCTTCAGGG TGTATGAAAT ATGAAGGATC  
 TGATTTTCAG TGCAAAGATT CTCCAAAAGC CCAGCTACGC  
 CGGACAATAG AATGTTGTCG GACCAATTTA TGTAACCAGT  
 ATTTGCAACC CACACTGCCC CCTGTTGTCA TAGGTCCGTT  
 TTTTGATGGC AGCATTCGAA CCGGTGGTGG AACTCACACA  
 TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGGACCGT  
 CAGTCTTCCT CTTCACCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT  
 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG  
 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG  
 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC  
 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT  
 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA  
 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA  
 CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT  
 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT  
 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC  
 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA  
 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAATGA

5 (SEQ ID NO:27)

Se aislaron las siguientes especies de proteína:

(1) La hALK3 (GA,30-152)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 28), que retiene una glicina-alanina inicial de la secuencia líder.

```

GA LHGTGMKSDS
DQKKESENGVT LAPEDTLPFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN
GHCFAIIEED DQGETTLASG CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR
RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG SIRTGGGTHT
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK* (SEQ ID NO:28)

```

5 (2) La hALK3(A,30-152)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 29), que retiene una alanina inicial de la secuencia líder.

```

A LHGTGMKSDS
DQKKESENGVT LAPEDTLPFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN
GHCFAIIEED DQGETTLASG CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR
RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG SIRTGGGTHT
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK* (SEQ ID NO:29)

```

10 (3) La secuencia de hALK3(31-152)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 30), en la que se extraen el líder y la leucina inicial, dejando una histidina inicial (efectivamente NΔ7).

```

HGTGMKSDS
DQKKESENGVT LAPEDTLPFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN
GHCFAIIEED DQGETTLASG CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR
RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG SIRTGGGTHT
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK* (SEQ ID NO:30)

```

(4) Una especie adicional, hALK3(30-152)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 31), se esperaba, pero no fue identificada por secuenciación N-terminal.

LHGTGMKSDS

DQKKESENGVT LAPEDTLPFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN  
GHCFAIIEED DQGETTLASG CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR  
RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG SIRTGGGTHT  
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
QPENNYKTPP PVLDSDGSEF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:31)

E. Un ácido nucleico que codifica hALK3(30-146)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 32), se expresó en células CHO:

ATGG

ATGCAATGAA GAGAGGGCTC TGCTGTGTGC TGCTGCTGTG  
TGGAGCAGTC TTCGTTTCGC CCGGCGCCCT TCATGGCACT  
GGGATGAAAT CAGACTCCGA CCAGAAAAAG TCAGAAAATG

GAGTAACCTT AGCACCAGAG GATACCTTGC CTTTTTTAAA  
 GTGCTATTGC TCAGGGCACT GTCCAGATGA TGCTATTAAT  
 AACACATGCA TAACTAATGG ACATTGCTTT GCCATCATAG  
 AAGAAGATGA CCAGGGAGAA ACCACATTAG CTCAGGGTG  
 TATGAAATAT GAAGGATCTG ATTTTCAGTG CAAAGATTCT  
 CCAAAAGCCC AGCTACGCCG GACAATAGAA TGTTGTCGGA  
 CCAATTTATG TAACCAGTAT TTGCAACCCA CACTGCCCCC  
 TGTTGTCATA GGTCCGTTTA CCGGTGGTGG AACTCACACA  
 TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGGACCGT  
 CAGTCTTCCT CTTCACCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT  
 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 GTGAGCCAG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG  
 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG  
 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT  
 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA  
 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA  
 CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT  
 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT  
 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC  
 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA  
 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGA

(SEQ ID NO: 32)

Se aislaron las siguientes especies de proteína:

(1) La hALK3(GA,30-146)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 33), que retiene una glicina-alanina inicial de la secuencia líder.

GALHGT

5 GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
 NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS  
 PKAQLRRTIE CCRTNLCNOY LQPTLPPVVI GPFTGGGTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDSDGSEF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO: 33)

(2) La hALK3(A,30-146)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 34), que retiene una alanina inicial de la secuencia líder.

ALHGT

GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
 NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS  
 PKAQLRRITIE CCRTNLCNQY LQPTLPPVVI GPFTGGGTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO: 34)

5 (3) La secuencia de hALK3(31-146)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 35), en la que se extraen el líder y la leucina inicial, dejando una histidina inicial (efectivamente NΔ7CΔ6).

HGT

GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
 NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS  
 PKAQLRRITIE CCRTNLCNQY LQPTLPPVVI GPFTGGGTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO: 35)

(4) Una especie adicional, hALK3(30-146)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 36), se esperaba, pero no fue identificada por secuenciación N-terminal.

LHGT

GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
 NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS  
 PKAQLRRITIE CCRTNLCNQY LQPTLPPVVI GPFTGGGTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO: 36)

10

F. Un ácido nucleico que codifica hALK3(30-140)-hFc, mostrado a continuación (SEQ ID NO: 37), se puede expresar en células CHO:

ATGGAT GCAATGAAGA GAGGGCTCTG  
 CTGTGTGCTG CTGCTGTGTG GAGCAGTCTT CGTTTCGCCC  
 GCGGCCCTTC ATGGCACTGG GATGAAATCA GACTCCGACC  
 AGAAAAAGTC AGAAAATGGA GTAACCTTAG CACCAGAGGA  
 TACCTTGCCCT TTTTAAAGT GCTATTGCTC AGGGCACTGT  
 CCAGATGATG CTATTAATAA CACATGCATA ACTAATGGAC  
 ATTGCTTTGC CATCATAGAA GAAGATGACC AGGGAGAAAC  
 CACATTAGCT TCAGGGTGTA TGAAATATGA AGGATCTGAT  
 TTTCAGTGCA AAGATTCTCC AAAAGCCCAG CTACGCCGGA  
 CAATAGAATG TTGTCGGACC AATTTATGTA ACCAGTATTT  
 GCAACCCACA CTGCCCCCTA CCGGTGGTGG AACTCACACA  
 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGACCGT  
 CAGTCTTCCCT CTTCCCCCA AAACCAAGG ACACCCTCAT  
 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG  
 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG  
 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC  
 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCAT  
 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA  
 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA  
 CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT  
 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT  
 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC  
 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA  
 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAATGA

(SEQ ID NO: 37)

Las siguientes especies de proteínas se pueden aislar:

- 5 (1) La hALK3(GA,30-140)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 38), que retiene una glicina-alanina inicial de la secuencia líder.

GALHGTGMKS DSDQKKSENG VTLAPEDTLP FLKCYCSGHC  
 PDDAINNTCI TNGHCFAIIE EDDQGETTLA SGCMKYEGSD  
 FQCKDSPKAQ LRRTIECCRT NLCNQYLQPT LPPTGGGHTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:38)

(2) La hALK3(A,30-140)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 39), que retiene una alanina inicial de la secuencia líder.

ALHGTGMKS DSDQKKSENG VTLAPEDTLP FLKCYCSGHC  
 PDDAINNTCI TNGHCFAIIE EDDQGETTLA SGCMKYEGSD  
 FQCKDSPKAQ LRRTIECCRT NLCNQYLQPT LPPTGGGHTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:39)

5 (3) La secuencia hALK3(31-140)-hFc, mostrada a continuación (SEQ ID NO: 40), en la que se extraen el líder y la leucina inicial, dejando una histidina inicial (efectivamente NΔ7CΔ12).

HGTGMKS DSDQKKSENG VTLAPEDTLP FLKCYCSGHC  
 PDDAINNTCI TNGHCFAIIE EDDQGETTLA SGCMKYEGSD  
 FQCKDSPKAQ LRRTIECCRT NLCNQYLQPT LPPTGGGHTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
 QPENNYKTP PVLDSDGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:40)

(4) Una especie adicional, hALK3(30-140)-hFc, se muestra a continuación (SEQ ID N°: 41).

LHGTGMKS DSDQKKESENG VTLAPEDTLP FLKCYCSGHC  
PDDAINNTCI TNGHCFAIIE EDDQGETTLA SGCMKYEGSD  
FQCKDSPKAQ LRRTIECCRT NLCNQYLQPT LPPTGGGTHT  
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK\* (SEQ ID NO:41)

Aunque se han discutido realizaciones específicas de la materia objeto, la anterior memoria descriptiva es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones siguientes. El alcance completo de la invención debe ser determinado por referencia a las reivindicaciones y a la memoria descriptiva.

5

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos 95% pura con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el polipéptido es al menos 95% puro, con respecto a los contaminantes de proteína, como se determina por cromatografía de exclusión por tamaños.
4. El polipéptido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el polipéptido exhibe una constante de disociación para BMP2 o BMP4 no mayor que  $10^{-8}$  M.
- 10 5. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de codificación para el polipéptido de cualquier reivindicación precedente.
6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 12.
- 15 7. Un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia promotora unida operativamente a un polinucleótido de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6.
8. Un antagonista de BMP o ALK3 para uso en un método para promover el crecimiento del hueso, aumentar la densidad ósea o aumentar la resistencia ósea, o para uso en un método para tratar o prevenir un trastorno óseo, en el que el antagonista de BMP o ALK3 es seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 a) un polipéptido soluble que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica con respecto a SEQ ID NO: 3;
- b) un anticuerpo que se une a BMP2 e inhibe la interacción entre BMP2 y ALK3;
- c) un anticuerpo que se une a BMP4 e inhibe la interacción entre BMP4 y ALK3;
- d) un anticuerpo que se une a ALK3 e inhibe la interacción entre ALK3 y uno o más ligandos de ALK3; y
- 25 e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a los aminoácidos 8-117 de la SEQ ID NO: 3 ó 100% idéntica a los aminoácidos 8-117 de la SEQ ID NO: 3.
9. El antagonista para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polipéptido de la parte (a) o (b) tiene una o más de las siguientes características:
- i) se une a un ligando de ALK3 con una  $K_D$  de al menos  $10^{-7}$  M; e
- ii) inhibe la señalización de ALK3 en una célula.
- 30 10. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicho antagonista es una proteína de fusión que incluye, además de un dominio de polipéptido de ALK3, una porción de polipéptido seleccionada del grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
- 35 11. El antagonista para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 10, en el que el polipéptido de la parte (a) o (e) incluye uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados a partir de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.
- 40 12. El antagonista para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el trastorno relacionado con el hueso se selecciona a partir del grupo que consiste en: osteoporosis primaria, osteoporosis secundaria, osteoporosis postmenopáusica, pérdida ósea en hipogonadismo, pérdida ósea inducida por tumor, pérdida ósea inducida por terapia del cáncer, metástasis óseas, mieloma múltiple y enfermedad de Paget.
13. El antagonista para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que el método comprende además administrar un segundo agente activo óseo.
- 45 14. El antagonista para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el agente activo óseo se selecciona a partir del grupo que consiste en: un bifosfonato, un estrógeno, un modulador del receptor de estrógenos selectivos, una hormona paratiroidea, una calcitonina, un suplemento de calcio y un suplemento de la vitamina D.
15. El antagonista para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polipéptido de la parte (a) o (e) no se une al BMP6 humano ni al BMP7 humano.

16. El antagonista para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, el cual es para promover el crecimiento del hueso.
17. El antagonista para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, el cual es para aumentar la densidad ósea o aumentar la resistencia ósea.
- 5 18. El antagonista para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, el cual es para tratar o prevenir un trastorno óseo.
- 10 19. Un antagonista del polipéptido de BMP o ALK3 que comprende una primera secuencia de aminoácidos a partir del dominio extracelular de ALK3 humano y una secuencia de aminoácidos heteróloga, en el que la primera secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia que comienza en cualquiera de las posiciones 25 a 31 de SEQ ID NO:1 y que termina en cualquiera de las posiciones 140 a 152 de SEQ ID NO:1.
20. El polipéptido de la reivindicación 19, en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende un dominio constante de un anticuerpo.
21. El polipéptido de la reivindicación 19, en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende un dominio Fc de una IgG.
- 15 22. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que la IgG es la IgG1 humana.
23. Un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 y 41.
- 20 24. El polipéptido de la reivindicación 23, que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 11, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40 y 41.
- 25 25. El polipéptido de la reivindicación 1, 23 ó 24, que está glicosilado.
26. El polipéptido de la reivindicación 1, 23 ó 24, que estimula la formación de hueso o el aumento de la densidad mineral ósea en un animal.
27. El polipéptido de la reivindicación 1, 23 ó 24, que se produce por la expresión en células CHO.
28. Un homodímero que comprende dos polipéptidos de la reivindicación 1 o dos polipéptidos de la reivindicación 23 ó 24.
29. Una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1, 23 ó la reivindicación 24 o el homodímero de la reivindicación 28 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 30. La preparación farmacéutica de la reivindicación 29, que está sustancialmente libre de pirógenos.
31. El polipéptido de la reivindicación 23 ó la reivindicación 24, que está codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada a partir de: SEQ ID NOs: 12, 15, 21, 24, 27, 32 y 37.
- 35 32. El polipéptido de la reivindicación 31, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada a partir de: SEQ ID NOs: 12, 15, 21, 24, 27, 32 y 37.
33. Una célula aislada que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5, 31 ó 32.
34. La célula de la reivindicación 33, que es una célula de mamífero.
35. La célula de la reivindicación 34, en el que la célula es una célula CHO o una célula humana.

Figura 1. Secuencia de aminoácidos para el precursor de ALK3

```
1 mpqlyiyirl lgaylfiisr vqgnldsmi hgtgmksdsd gkksengvti apedtlfk  
61 cycsqhpcdd ainntcitng hcfaiieedd qgettlasgc mkyegsdfgc kdspkaqlrr  
121 tieccrtnlc ngylqptlpp vvigpffdgs irwlvllism avciiamiif sscfcykhyc  
181 ksissrrryn rdleqdeafi pvgeslkdli dqsqssgsgs glpllvqrti akqiqmvrqv  
241 gkgrygevwm gkwrgekvav kvfftteeas wfreteiyqt vlmrhenilg fiaadikgtg  
301 swtqlylitd yhengsllydf lkcatldtra llklaysaac glchlhteiy gtqgkpaiah  
361 rdlksknili kknsgcciad lglavkfnsd tnevdpvplnt rvgtkrymap evldeslnkn  
421 hfqpyimadi ysfgliiwem arrcitggiv eeyqlpyynm vpsdpsyedm revvcvkrir  
481 pivsnrwnsd eclraviklm secwahnpas rltalrikkt lakmvesqdv ki  
(SEQ ID NO: 1)
```

Figura 2. Secuencia de nucleótidos para la proteína del precursor humano de ALK3

1 atgcctcagc tatacattta catcagatta ttgggagcct atttgttcat catttctcgt  
 61 gttcaaggac agaatctgga tagtatgctt catggcactg ggatgaaatc agactccgac  
 121 cagaaaaagt cagaaaatgg agtaacctta gcaccagagg ataccttgcc ttttttaaag  
 181 tgctattgct cagggcactg tccagatgat gctattaata acacatgcat aactaatgga  
 241 cattgctttg ccatcataga agaagatgac cagggagaaa ccacattagc ttcaggggtg  
 301 atgaaatatg aaggatctga ttttcagtgc aaagattctc caaaagccca gctacgcccg  
 361 acaatagaat gttgtcggac caatttatgt aaccagtatt tgcaaccac actgccccc  
 421 gttgcacatag gtccgttttt tgatggcagc attcagatggc tggttttgct catttctatg  
 481 gctgtctgca taattgctat gatcatcttc tccagctgct tttgttaca acattattgc  
 541 aagagcatct caagcagacg tcgttacaat cgtgatttgg aacaggatga agcatttatt  
 601 ccagttggag aatcactaaa agaccttatt gaccagtac aaagttctgg tagtgggtct  
 661 ggactacctt tattggttca gcgaactatt gccaaacaga ttcagatggt ccggcaagtt  
 721 ggtaaggcc gatatggaga agtatggatg ggcaaatggc gtggcgaaaa agtggcgggtg  
 781 aaagtattct ttaccactga agaagccagc tggtttcgag aaacagaaat ctaccaaact  
 841 gtgctaagc gccatgaaaa catacttggg ttcatagcgg cagacattaa aggtacaggt  
 901 tcctggactc agctctattt gattactgat taccatgaaa atggatctct ctatgacttc  
 961 ctgaaatgtg ctacactgga caccagagcc ctgcttaaat tggcttattc agctgcctgt  
 1021 ggtctgtgcc acctgcacac agaaatztat ggcacccaag gaaagcccgc aattgctcat  
 1081 cgagacctaa agagcaaaaa catcctcatc aagaaaaatg ggagttgctg cattgctgac  
 1141 ctgggccttg ctgttaaatt caacagtgac acaaatgaag ttgatgtgcc cttgaatacc  
 1201 aggggtgggca ccaaacgcta catggctccc gaagtgtggt acgaaagcct gaacaaaaac  
 1261 caattccage cctacatcat ggctgacatc tacagcttcg gcctaatcat ttgggagatg  
 1321 gctcgtcgtt gtatcacagg agggatcgtg gaagaatacc aattgccata ttacaacatg  
 1381 gtaccgagtg atccgtcata cgaagatatg cgtgaggttg tgtgtgtcaa acgtttgcgg  
 1441 ccaattgtgt ctaatcgggtg gaacagtgat gaatgtctac gagcagtttt gaagctaag  
 1501 tcagaatgct gggcccacaa tccagcctcc agactcacag cattgagaat taagaagacg  
 1561 cttgcccaaga tggttgaatc ccaagatgta aaaatc (SEQ ID NO: 2)

**Figura 3. Secuencia de aminoácidos para el ALK3 nativo humano**

```
1  qnldsmhgt gmksdsdqkk sengvtlape dtlpflkyc sghcpddain ntcitnghcf  
61  aiieeddqge ttlasgcmky eg sdfqckds pkaqlrrtie ccrtnlcnqy lqptlppvvi  
121 gpffdgsir (SEQ ID NO: 3)
```

**Figura 4. Secuencia de nucleótidos para el ECD de ALK3**

```
1  cagaatctgg atagtatgct tcatggcact gggatgaaat cagactccga ccagaaaaag
61  tcagaaaatg gagtaacctt agcaccagag gataccttgc cttttttaa gtgctattgc
121 tcagggcact gtccagatga tgctattaat aacacatgca taactaatgg acattgcttt
181 gccatcatag aagaagatga ccagggagaa accacattag cttcagggtg tatgaaatat
241 gaaggatctg attttcagtg caaagattct ccaaaagccc agctacgccg gacaatagaa
301 tgttgtcgga ccaatttatg taaccagtat ttgcaacca cactgcccc tgttgtcata
361 ggtccgtttt ttgatggcag cattcga (SEQ ID NO: 4)
```

**Figura 5. Secuencia de aminoácidos para el dominio nativo Fc humano**

```
1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPKPKDILM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLP GK (SEQ ID NO: 5)
```

**Figura 6. Secuencia de nucleótidos nativa para el Fc humano**

```

1   ACTCACACAT GCCCACCCTG CCCAGCACCT GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC
61  TTCCCCCAA AACCCAAGGA CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG
121 GTGGTGGACG TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
181 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACCGTGIG
241 GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG
301 GTCICCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG
361 CCCCAGAGAAC CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG
421 GTCAGCCTGA CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
481 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGGA CTCCGACGGC
541 TCCTTCCTCC TCIATAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC
601 TTCTCATGCT CCGTIGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC
661 CTGTCCCGG GTAAATGA (SEQ ID NO: 6)

```

Figura 7. Secuencia de aminoácidos para el hALK(24-152)-hFc sin líder

1 QNLDSMLHGT GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN  
 51 NTCITNGHCF AIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS PKAQLRRIT  
 101 CCRTNLCNOY LQPTLPPVVI GPFSDGSIRT GGGTHCPC PAPELLGGPS  
 151 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKENWYV DGVEVHNAKT  
 201 KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA  
 251 KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN  
 301 NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK  
 351 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 7)

Figura 8. Secuencia de aminoácidos para el TPA-hALK3(24-152)-hFc

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGAQNLD SM LHGTGMKSDS DQKKSENGVT  
 51 LAPEDILPFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCFAIIEED DQGETTLASG  
 101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG  
 151 SIR**TGGG**THT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 201 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
 251 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL  
 301 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS  
 351 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 11)

Figura 9. Una secuencia de nucleótidos para el TPA-hALK3(24-152)-hFc

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG TCAGAAGCAA

61  TCGCCCGGCG CCCAGAATCT GGATAGTATG CTTCAATGGCA CTGGGATGAA ATCAGACTCC
   AGCGGGCCGC GGGTCTTAGA CCIATCATA C GAAGTACCGT GACCCTACTT TAGTCTGAGG

121 GACCAGAAAA AGTCAGAAAA TGGAGTAACC TTAGCACCAG AGGATACCTT GCCTTTTTTA
   CTGGTCTTTT TCAGTCTTTT ACCTCATTGG AATCGTGGTC TCCTATGGAA CGGAAAAAAT

181 AAGTGCTATT GCTCAGGGCA CTGTCCAGAT GATGCTATTA ATAACACATG CATAACTAAT
   TTCACGATAA CGAGTCCCGT GACAGGTCTA CTACGATAAT TATTGTGTAC GTATTGATTA

241 GGACATTGCT TTGCCATCAT AGAAGAAGAT GACCAGGGAG AAACCACATT AGCTTCAGGG
   CCTGTAACGA AACGGTAGTA TCTTCTTCTA CTGGTCCCTC TTTGGTGTAA TCGAAGTCCC

301 TGIATGAAAT ATGAAGGATC IGATTTTCAG TGCAAAGATT CTCCAAAAGC CCAGCTACGC
   ACATACTTTA TACTTCTTAG ACTAAAAGTC ACGTTTCTAA GAGGTTTTTCG GGTCTGATGC

361 CGGACAATAG AATGTTGTCG GACCAATTTA TGTAACCAGT ATTTGCAACC CACACTGCCC
   GCCTGTTATC TTACAACAGC CTGTTAAAT ACATTGGTCA TAAACGTTGG GTGTGACGGG

421 CCTGTTGTC TAGGTCGGTT TTTGATGGC AGCAITCGAA CCGGTGGGGG TACTCACACA
   GGACAACAGT ATCCAGGCAA AAAACTACCG TCGTAAGCTT GGCCACCCCC ATGAGTGTGT

481 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCTT CTTCCTCCCA
   ACGGGTGGCA CGGGTCGTGG ACTTGAGGAC CCCCCTGGCA GTCAGAAGGA GAAGGGGGGT

541 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCTGAGG TCACATGCCG GGTGGTGGAC
   TTTGGGTTCC TGTGGGAGTA CTAGAGGGCC TGGGGACTCC AGTGTACGCA CCACCACCTG

601 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
   CACTCGGTGC TTCTGGGACT CCAGTTCAAG TTGACCATGC ACCTGCCGCA CCTCCACGTA

661 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC
   TTACGGTTCT GTTTCGGCGC CCTCCCTGTC ATGTTGTCTG GCATGGCACA CCAGTCCGAG

721 CTCACCCTCC TGCACCAGGA CIGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCCTCAAC
   GAGTGGCAGG ACGTGGTCTT GACCGACTTA CCGTTCCTCA TGTTACGTT CCAGAGGTTG

781 AAAGCCCTCC CAGCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
   TTTGGGAGG GTCGGGGTA GCTCTTTTGG TAGAGTTTC GGTTCCTCGT CGGGGCTCTT

841 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGACCTG
   GGTGTCCACA TGTGGGACGG GGGTAGGGCC CTCCTCTACT GGTTCTTGGT CCAGTCCGAC
    
```

**Figura 9 (continuación). Una secuencia de nucleótidos para el TPA-hALK3(24-152)-hFc**

901    ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
       TGGACGGACC AGTTTCCGAA GATAGGGTCG CIGTAGCGGC ACCTCACCTT CTCGTTACCC  
  
 961    CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC  
       GTCGGCCTCT IGTTGATGTT CTGGTGCGGA GGCACGACC TGAGGCTGCC GAGGAAGAAG  
  
 1021   CTCTATAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCAIGC  
       GAGATATCGT TCGAGTGGCA CCTGTTCTCG TCCACCGTCG TCCCCTTGCA GAAGAGTACG  
  
 1081   TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCCCCG  
       AGGCACTACG TACTCCGAGA CGTGTTGGTG ATGTGCGTCT TCTCGGAGAG GGACAGGGGC  
  
 1141   GGTAAG    (Cadena sentido – SEQ ID NO: 12)  
       CCATTT    (Cadena antisentido – SEQ ID NO: 13)

Figura 10. Secuencia de aminoácidos para el TPA-hALK3(24-152)-mFc

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAQNLDSM LHGTGMKSDS DQKSENGVT  
 51 LAPEDTLFFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCFAIIEED DQGETTLASG  
 101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG  
 151 SIRTGGGGEPR VPITQNPCPP LKECPPCAAP DLLGGPSVFI FPPKIKDVLM  
 201 ISLSPMVTCV VVDVSEDDPD VQISWFVNNV EVHTAQQTQTH REDYNSTLRV  
 251 VSALPIQHGD WMSGKEFKCK VNNRALPSPI EKTISKPRGP VRAPQVYVLP  
 301 PPAEEMTKKE FSLTCMITGF LPAEIAVDWT SNGRTEQNYK NTATVLDSGD  
 351 SYFMYSKLRV QKSTWERGSL FACSVVHEGL HNHLTTKTIS RSLGK  
 (SEQ ID NO: 14)

Figura 11. Una secuencia de nucleótidos para el TPA-hALK3(24-152)-mFc

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG TCAGAAGCAA

61  TCGCCCGCGG CCCAGAACTCT GGATAGTATG CTTCAITGGCA CTGGGATGAA ATCAGACTCC
   AGCGGGCCCG GGGTCTTAGA CCTATCATA CAGGTACCGT GACCCTACTT TAGTCTGAGG

121  GACCAGAAAA AGTCAGAAAA TGGAGTAACC TTAGCACCAG AGGATACCTT GCCTTTTTTA
   CIGGTCITTT TCAGTCTTTT ACCTCATTGG AATCGTGGTC TCCTATGGAA CGGAAAAAAT

181  AAGTGCTATT GTCAGGGCA CTGTCCAGAT GATGCTATTA A1TAACACATG CATAACTAAT
   TTCAGATAA CGAGTCCCGT GACAGGTCTA CTACGATAAT TATTGTGTAC GTATTGATTA

241  GGACATIGCT TTGCCAICAT AGAAGAAGAT GACCAGGGAG AAACCACATT AGCTTCAGGG
   CCTGTAACGA AACGGTAGTA TCTTCTTCTA CTGGTCCCTC TTTGGTGTAA TCGAAGTCCC

301  TGTATGAAAT ATGAAGGATC IGATTTTTCAG TGCAAAGATT CTCCAAAAGC CCAGCTACGC
   ACATACTTTA TACTTCTTAG ACTAAAAGTC ACGTTTCTAA GAGGTTTTTCG GGTGATGCG

361  CGGACAATAG AATGTTGTCTG GACCAATTTA TGTAACCAGT ATTTGCAACC CACACTGCCC
   GCCTGTTATC TTACAACAGC CTGGTTAAAT ACATGGTICA TAAACGTTGG GTGTGACGGG

421  CCTGTGTGCA TAGGTCGGTT TTTTGAIGGC AGCATTGCAA CCGGTGGGGG TGAGCCCAGA
   GGACAACAGT ATCCAGGCAA AAAACTACCG TCGTAAGCTT GGCCACCCCC ACTCGGGTCT

481  GTGCCATAA CACAGAACCC CTGTCTCCA CTCAAAGAGT GTCCCCCATG CGCAGCTCCA
   CACGGGIATT GTGICTTGGG GACAGGAGGT GAGTTTCTCA CAGGGGTAC GCGTCGAGGT

541  GACCTCTTGG GTGGACCATC CGTCTTCTC TTCCCTCAA AGAICAAGGA IGTACTCATG
   CTGGAGAACC CACCTGGTAG GCAGAAGTAG AAGGGAGGT TCTAGTTCTT ACATGAGTAC

601  ATCTCCCTGA GCCCCATGGT CACATGTGTG GTGGTGGATG TGAGCGAGGA TGACCCAGAC
   TAGAGGGACT CGGGGTACCA GTGTACACAC CACCACCTAC ACTCGTCTCT ACTGGGTCTG

661  GTCAGATCA GCTGGTTTGT GAACAACGTG GAAGTACACA CAGCTCAGAC ACAAACCCAT
   CAGGTCTAGT CGACCAAACA CTTGTTGCAC CTTCAITGTT GTGAGTCTG TGTGTTGGTA

721  AGAGAGGATT ACAACAGTAC TCTCCGGGTG GTCAGTGCCC TCCCCATCCA GCACCAGGAC
   TCTCTCTAA TGTTGTCTAG AGAGGCCAC CAGTCACGGG AGGGGTAGGT CGTGGTCTCTG

781  TGGATGAGTG GCAAGGAGTT CAAATGCAAG GTCAACAACA GAGCCCTCCC ATCCCCATC
   ACCTACTCAC CGTTCTCAA GTTTACGTT CAGTTGTTGT CTCGGGAGGG TAGGGGGTAG

841  GAGAAAACCA TCTCAAAACC CAGAGGGCCA GTAAGAGCTC CACAGGTATA TGCTTTGCTT
   CTCTTTTGGT AGAGTTTTGG GTCTCCCGGT CATTCTCGAG GTGICCATAT ACAGAACGGA

901  CCACCAGCAG AAGAGATGAC TAAGAAAGAG TTCAGTCTGA CCTGCATGAT CACAGGCTTC
   GGTGGTCTGC TTCTCTACTG ATTCTTTCTC AAGTCAGACT GGACGTACTA GTGTCCGAAG

961  TTACCTGCCG AAATIGCTGT GGACTGGACC AGCAATGGGC GTACAGAGCA AAATAACAAG
   AATGGACGGC TTTAACGACA CTGACCTGG TCGTTACCCG CATGCTCTGT TTTGATGTTT

1021 AACACCGCAA CAGTCTGGA CTCTGATGTT TCTTACTTCA TGTACAGCAA GTCAGAGTA
   TTGTGGCGTT GTCAGGACCT GACACTACCA AGAATGAAGT ACATGTCGTT CGAGTCTCAT

1081 CAAAAGAGCA CTTGGGAAAG AGGAAAGTCTT TTCGCCTGCT CAGTGGTCCA CGAGGGTCTG
   GITTTCTCGT GAACCTTTC TCCTTCAGAA AAGCGGACGA GTCACCAGGT GCTCCAGAC
    
```

**Figura 11 (continuación). Una secuencia de nucleótidos para el TPA-hALK3(24-152)-mFc**

1141 CACAATCACC TTACGACTAA GACCATCTCC CGGTCICTGG GTAAA  
GTGTTAGTGG AATGCTGATT CTGGTAGAGG GCCAGAGACC CATT

(Cadena sentido – SEQ ID NO: 15)

(Cadena antisentido – SEQ ID NO: 16)

Figura 12

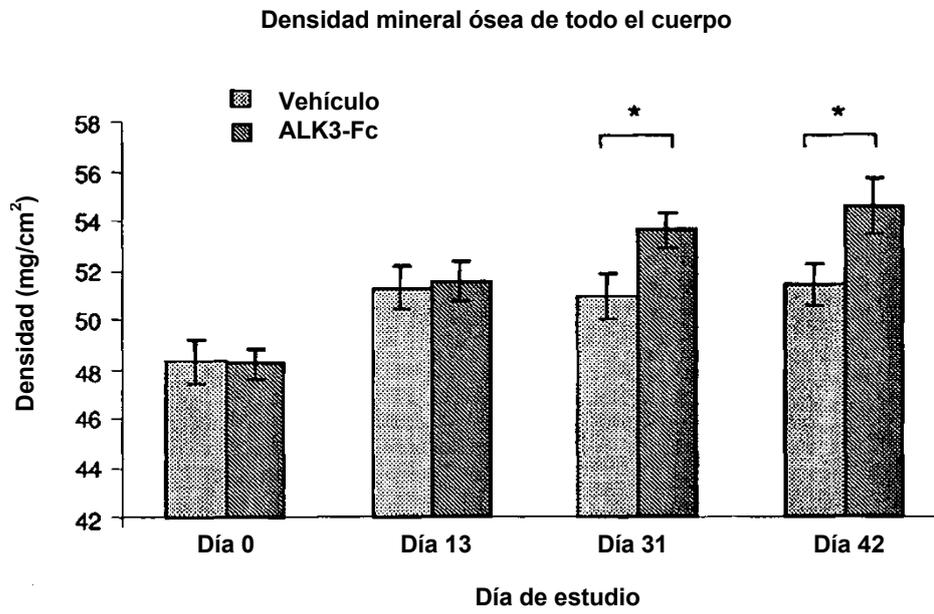


Figura 13

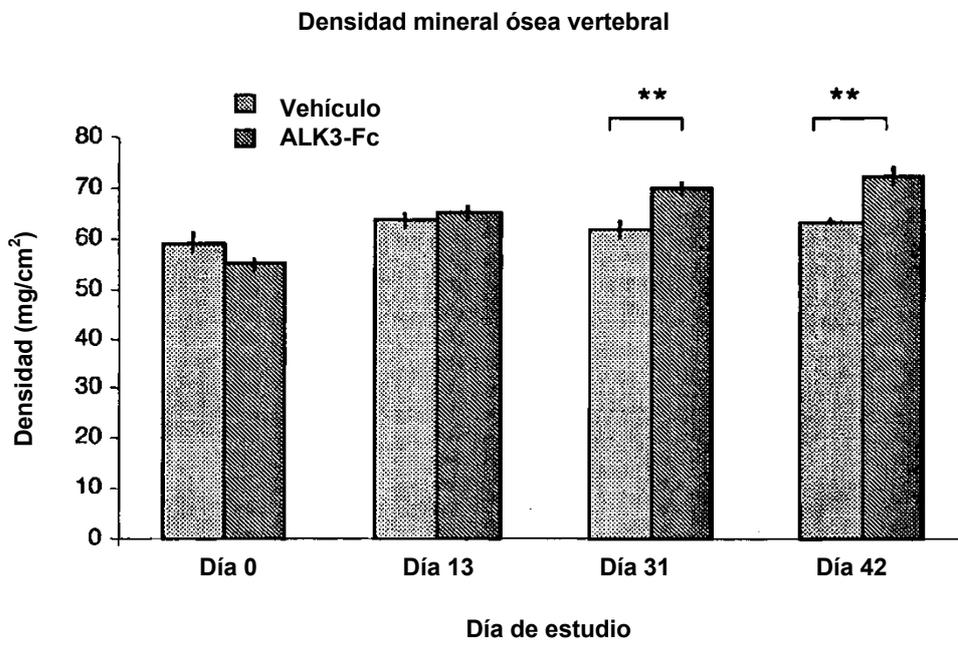


Figura 14

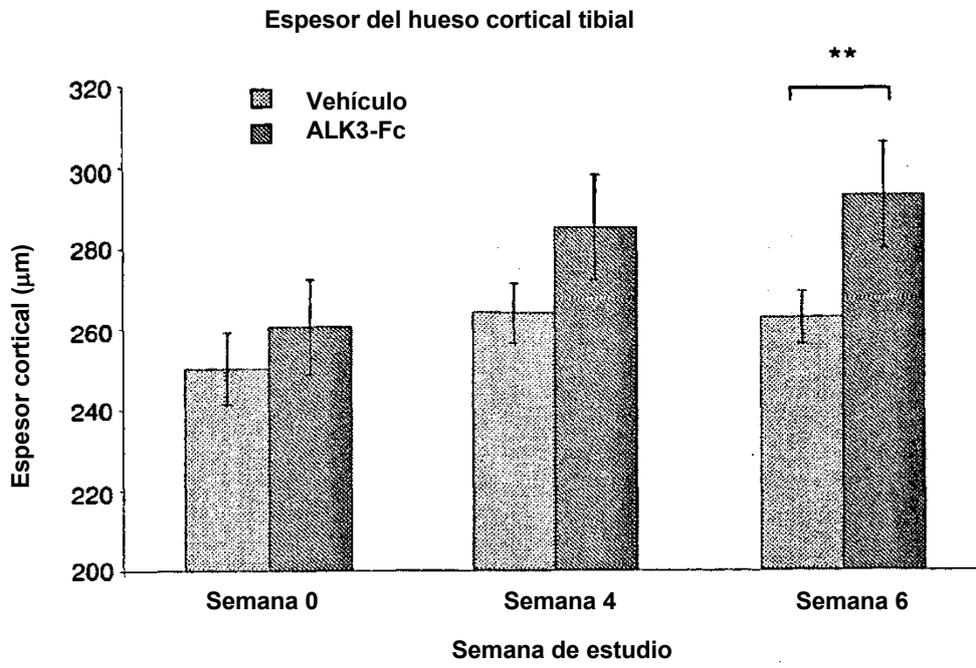


Figura 15

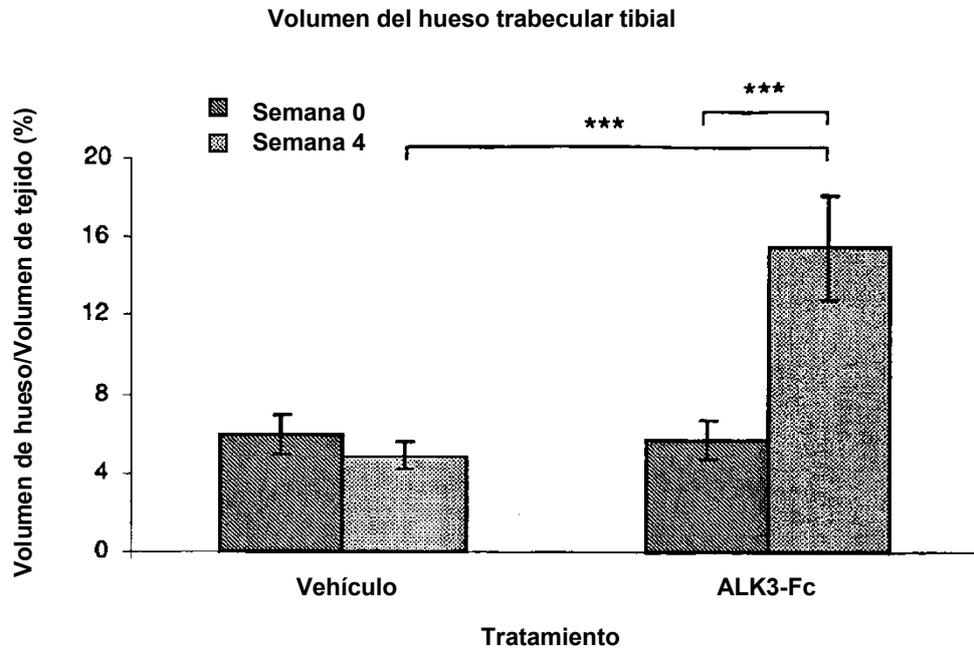


Figura 16

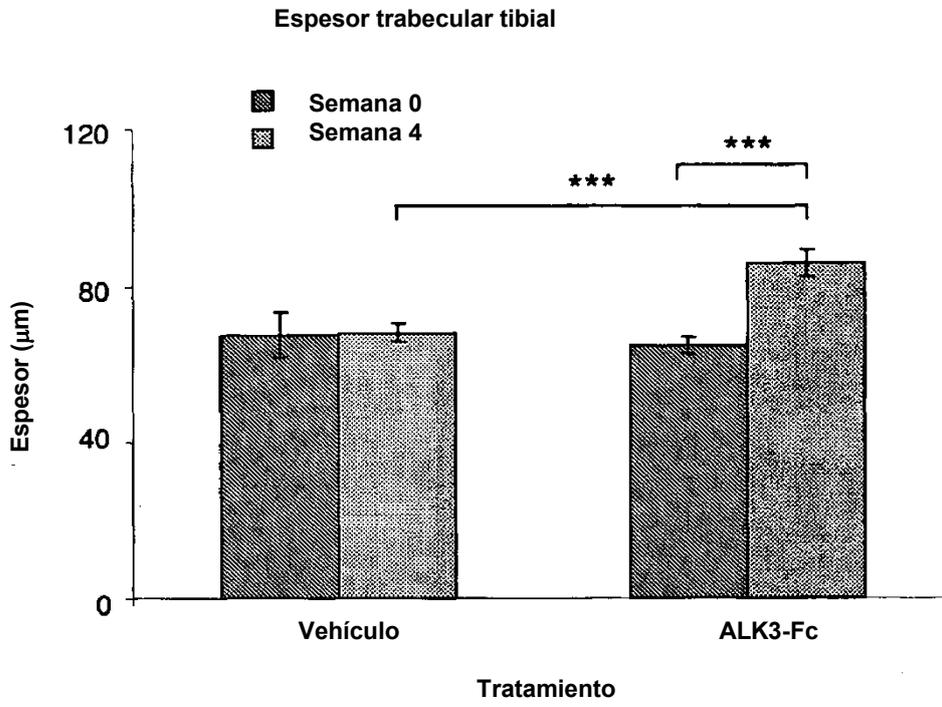


Figura 17. Efecto de ALK3-Fc en la microarquitectura del hueso trabecular

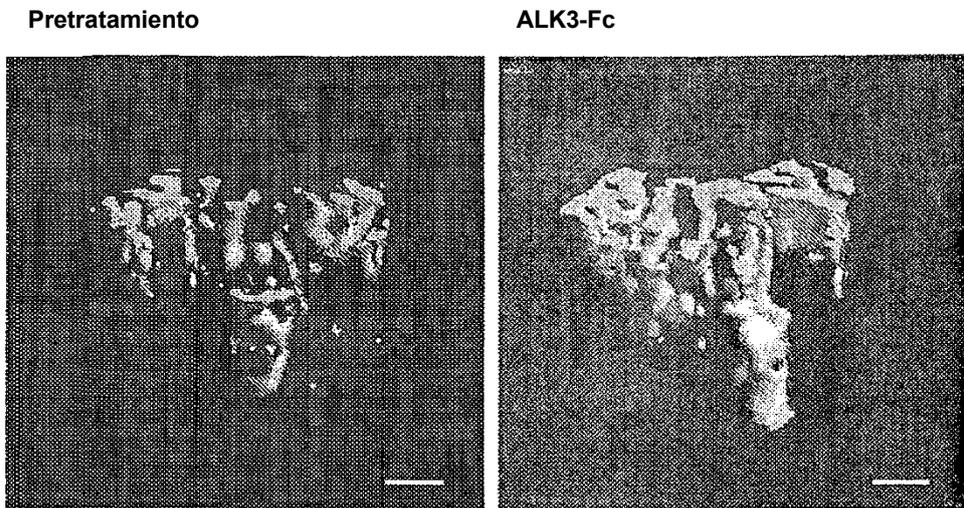


Figura 18. Enfoques para interferir con la señalización de BMP-ALK3

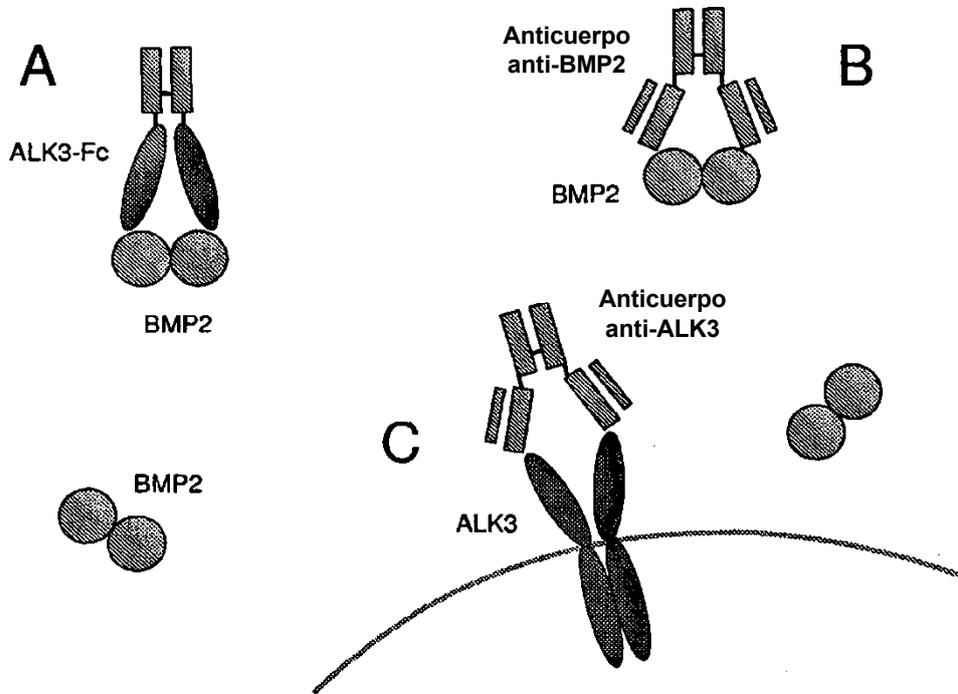


Figura 19. Efecto de hALK3-mFc sobre la carga ósea máxima

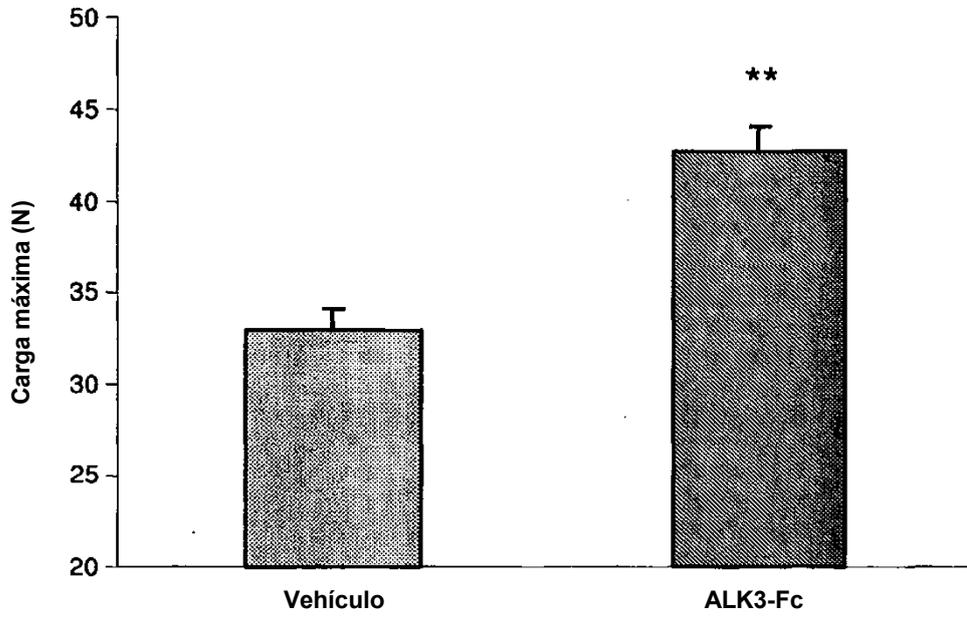


Figura 20. Efecto de hALK-mFc sobre la resistencia del hueso

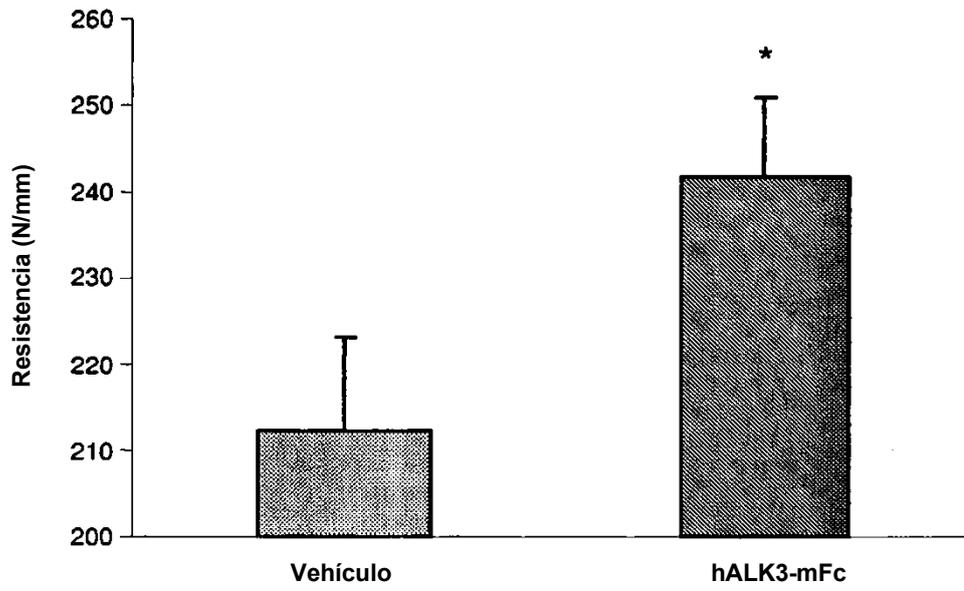


Figura 21. Efecto de hALK3-mFc sobre el fallo del hueso

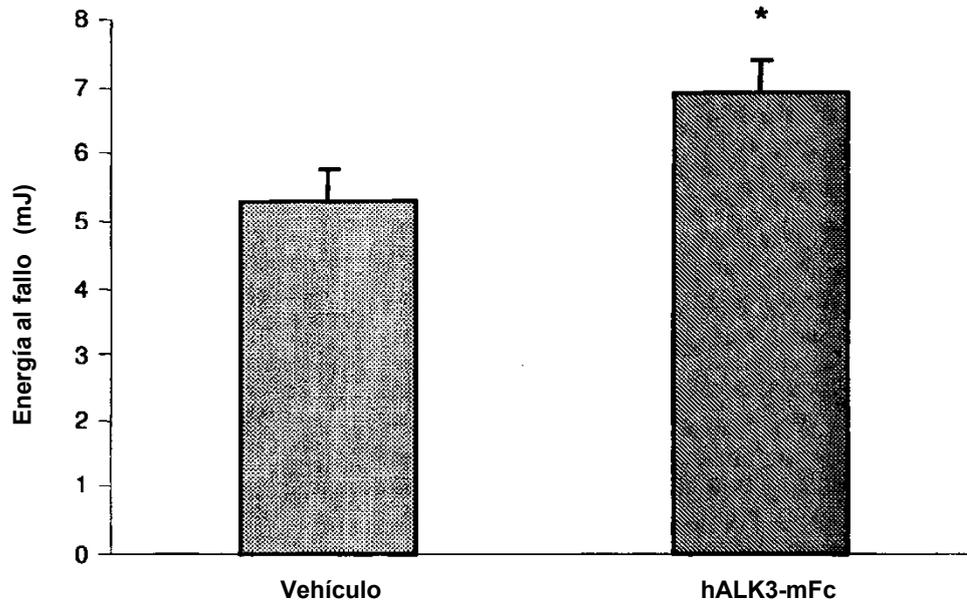


Figura 22. Efecto de hALK-mFc sobre el volumen del hueso trabecular en un modelo de ratón de osteopenia

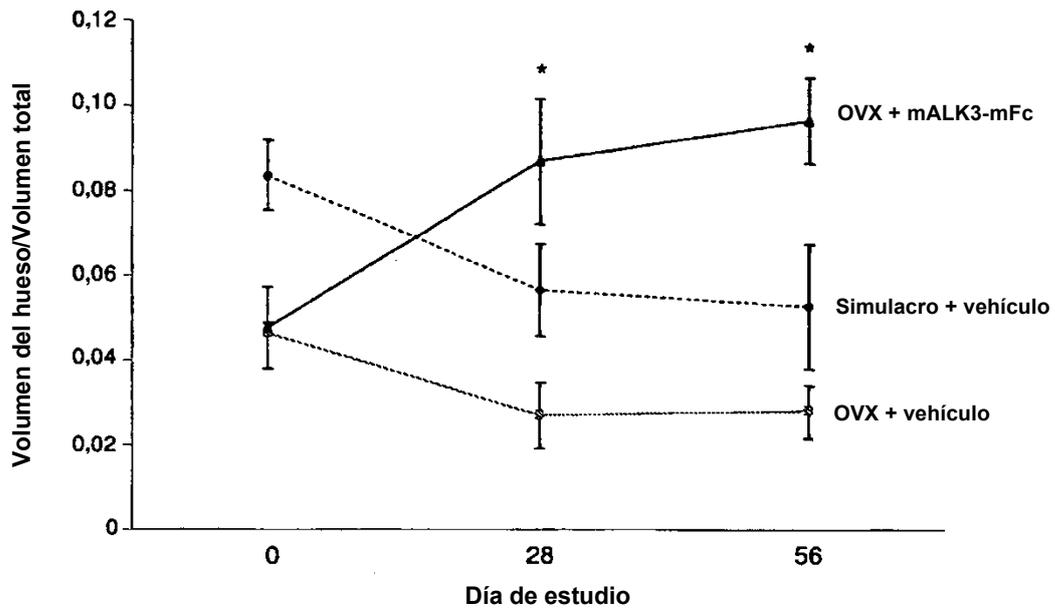


Figura 23. Efecto de mALK3-mFc sobre el espesor del hueso cortical en un modelo de ratón de osteopenia

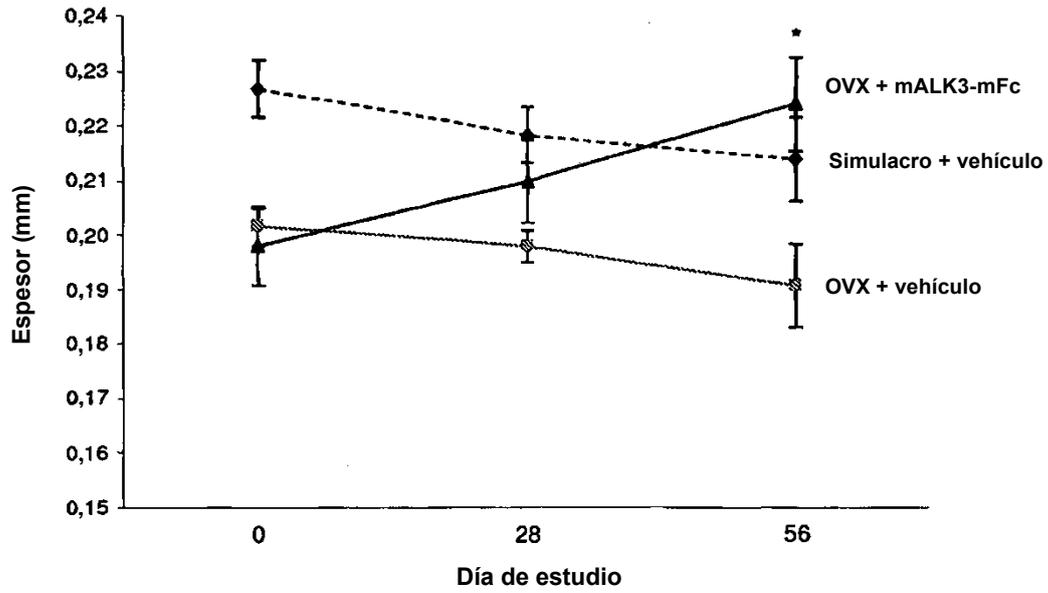


Figura 24. Efecto de mALK3-mFc sobre la circunferencia endosteal en un modelo de ratón de osteopenia

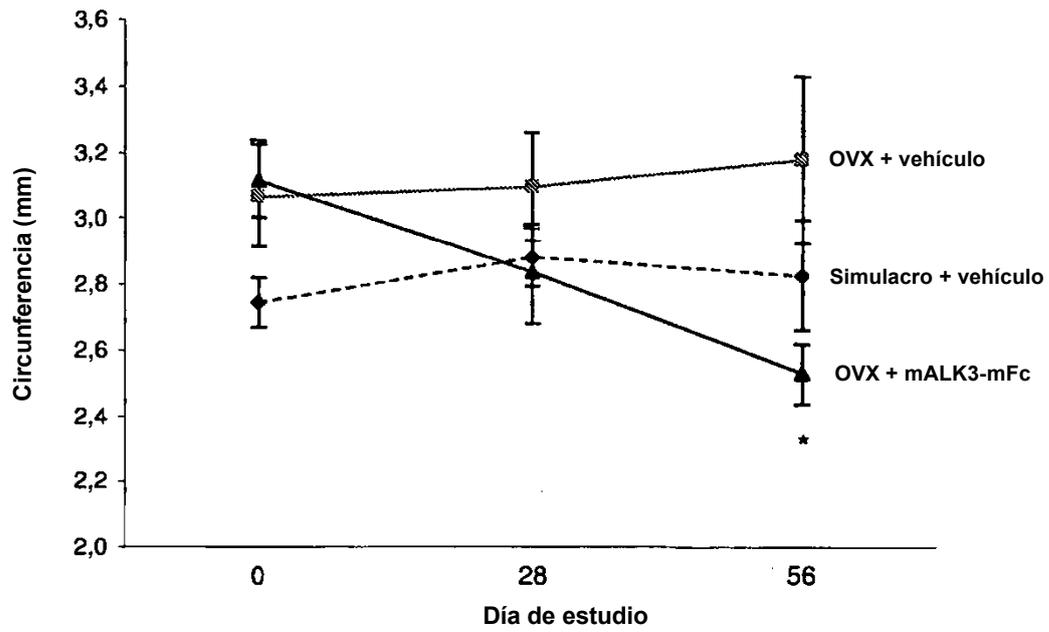


Figura 25. Efecto de mALK3-mFc sobre la densidad mineral ósea en todo el cuerpo en un modelo de ratón de osteopenia

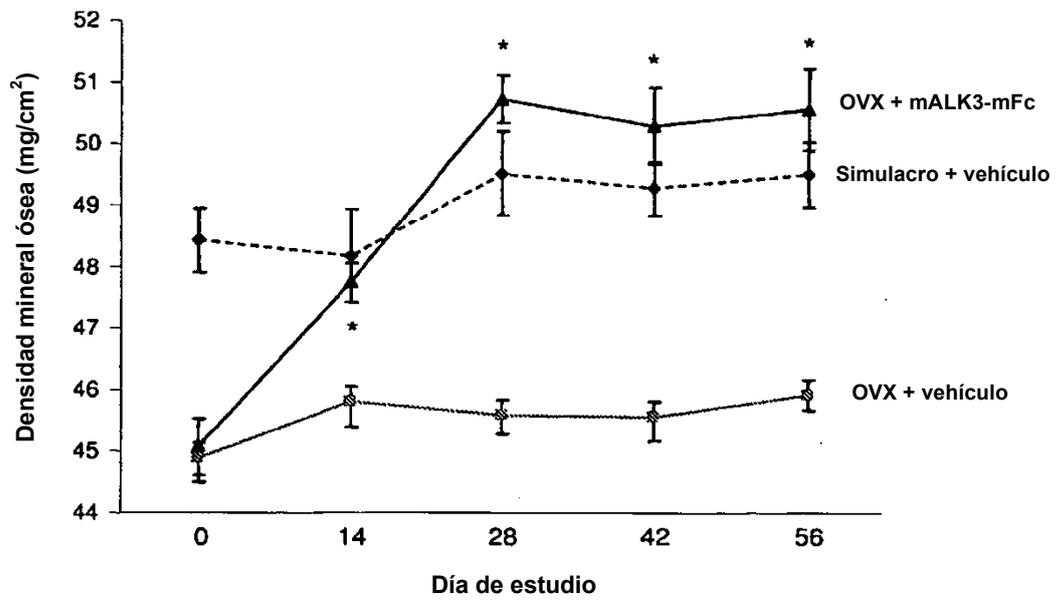


Figura 26. Efecto de mALK3-mFc sobre la densidad mineral ósea vertebral en un modelo de ratón de osteopenia

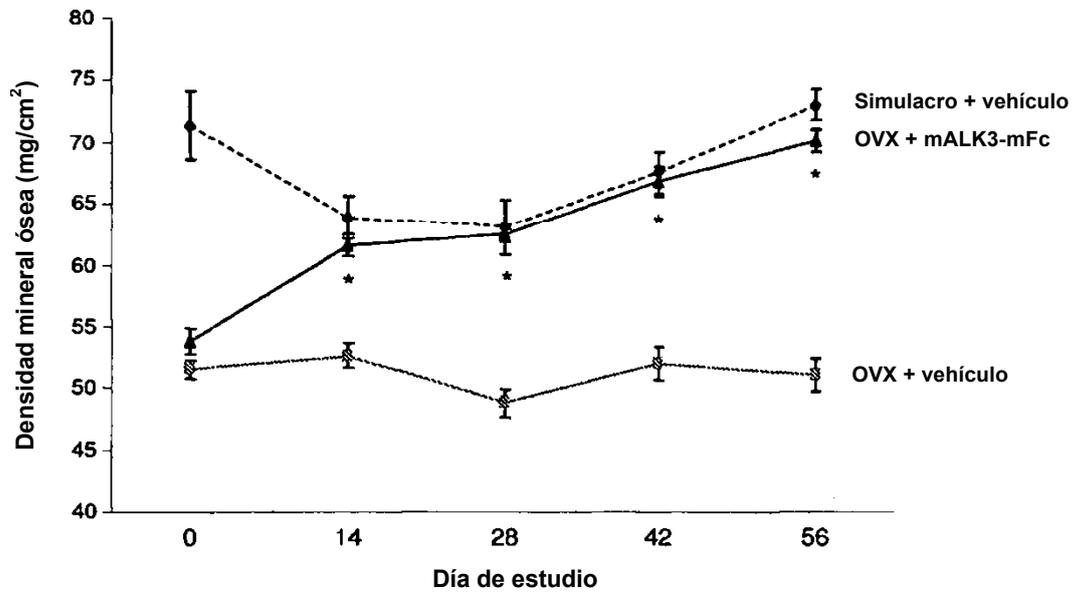
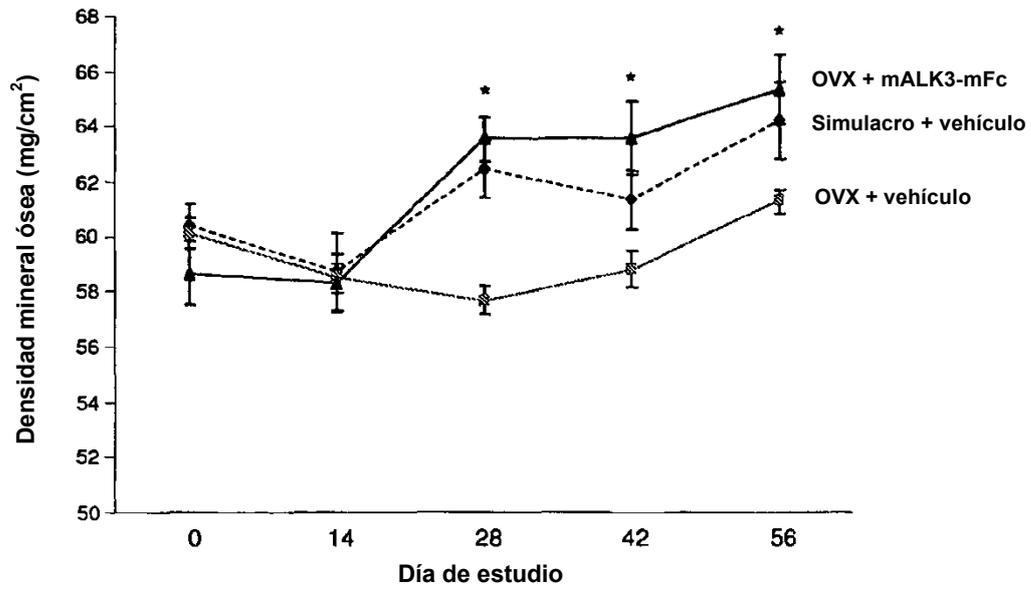
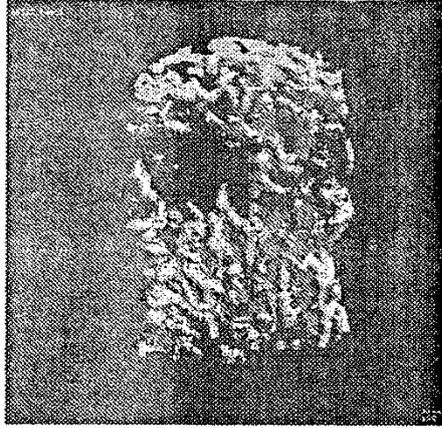


Figura 27. Efecto de mALK3-mFc sobre la densidad mineral ósea femoral-tibial en un modelo de ratón de osteopenia

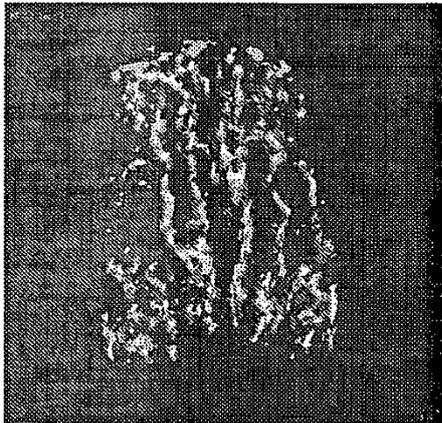


**Figura 28. Efecto de mALK3-mFc sobre la microarquitectura del hueso vertebral en un modelo de ratón de osteopenia**

**Simulacro + vehículo**



**OVX + vehículo**



**OVX + mALK3-mFc**

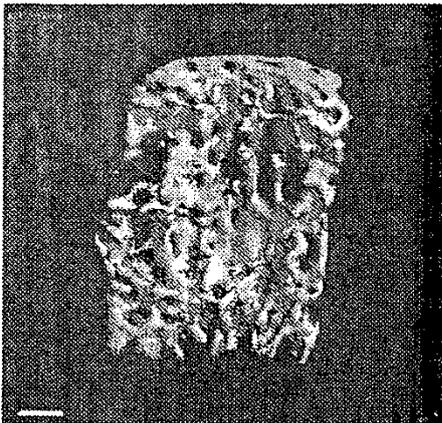


Figura 29. Efecto de mALK3-mFc sobre el volumen del hueso mediante histomorfometría en ratones

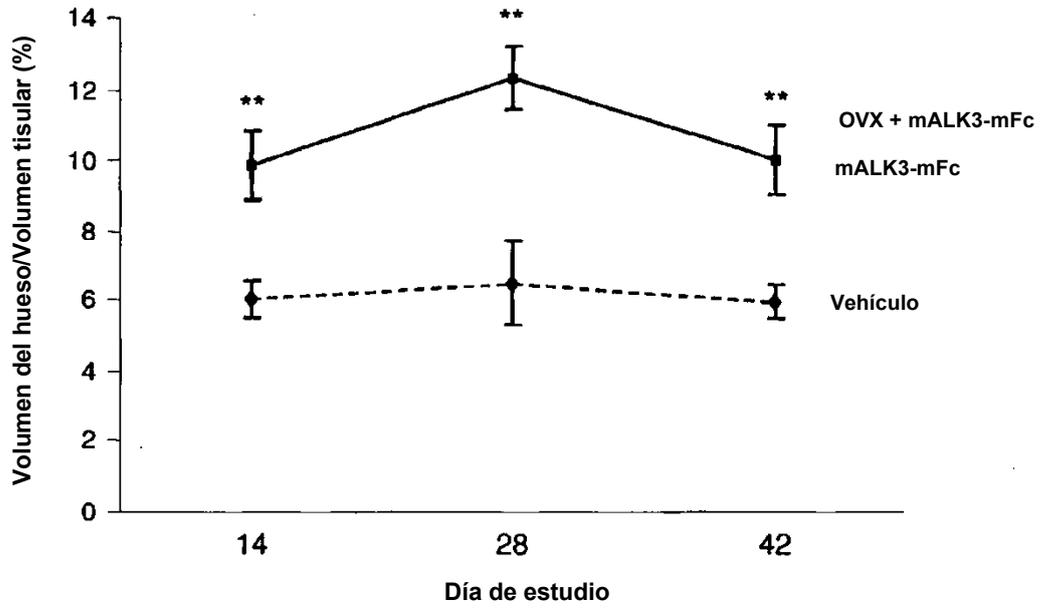


Figura 30. Efecto de mALK3-mFc sobre la formación del hueso evaluada mediante histomorfometría en ratones

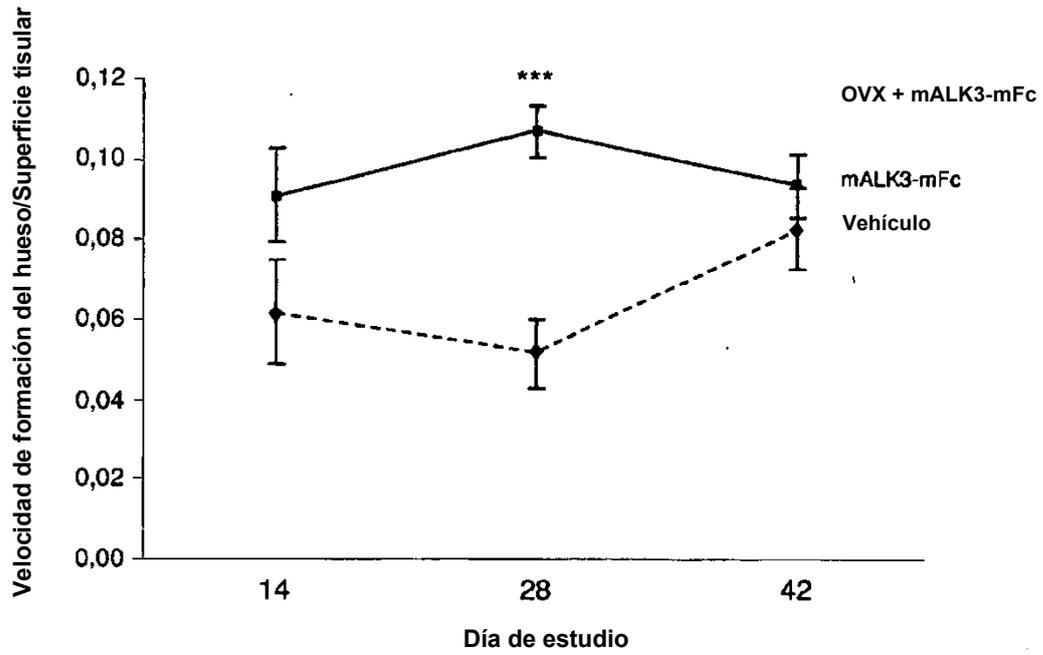


Figura 31. Efecto de mALK3-mFc sobre la superficie de mineralización del hueso mediante histomorfometría en ratones

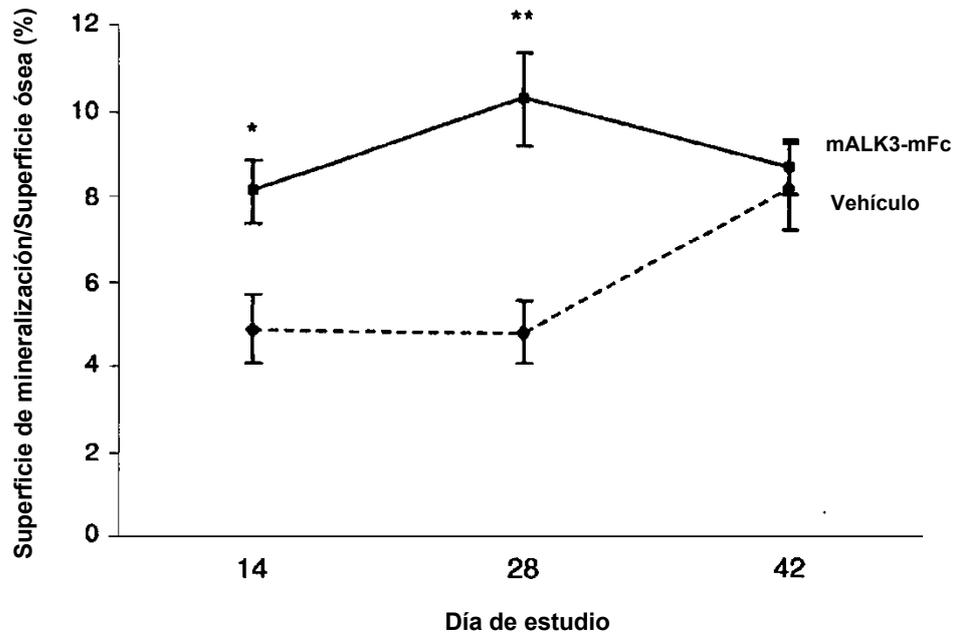


Figura 32. Efecto de mALK3-mFc sobre la superficie osteoclástica evaluada mediante histomorfometría en ratones

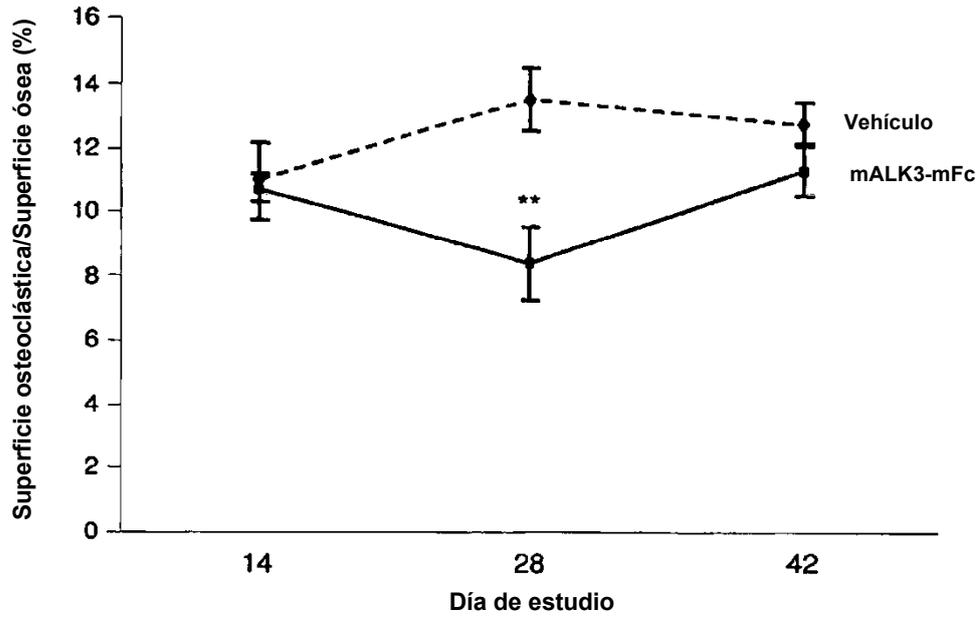


Figura 33. Efecto de mALK3-mFc sobre los niveles de RANKL sérico en ratones

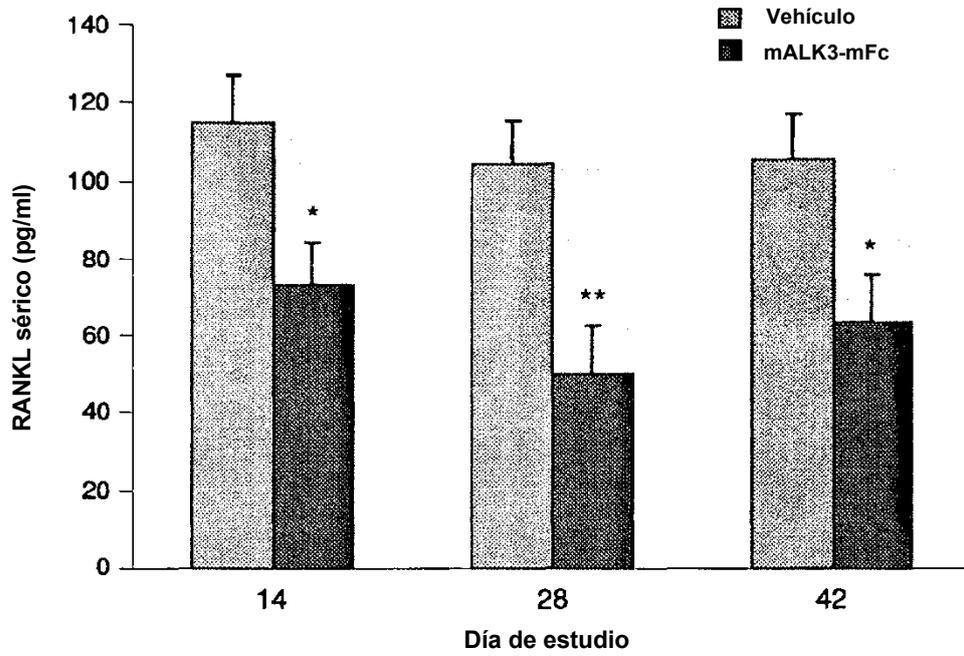


Figura 34. Efecto de mALK3-mFc sobre los niveles de osteoprotegerina sérica en ratones

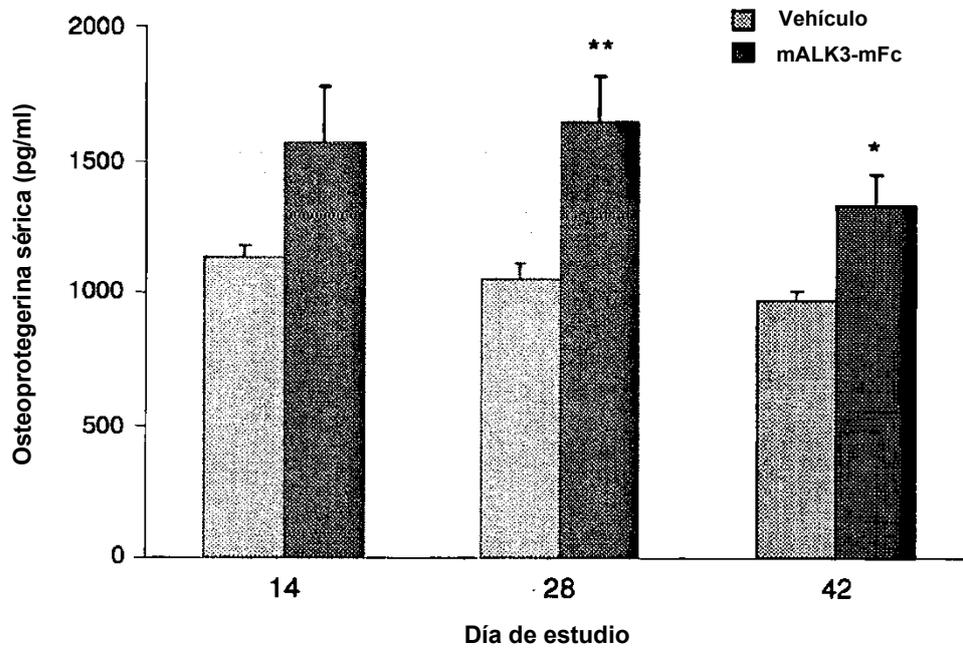


Figura 35. Efecto de mALK3-mFc sobre los niveles de ARN de esclerostina ósea en ratones

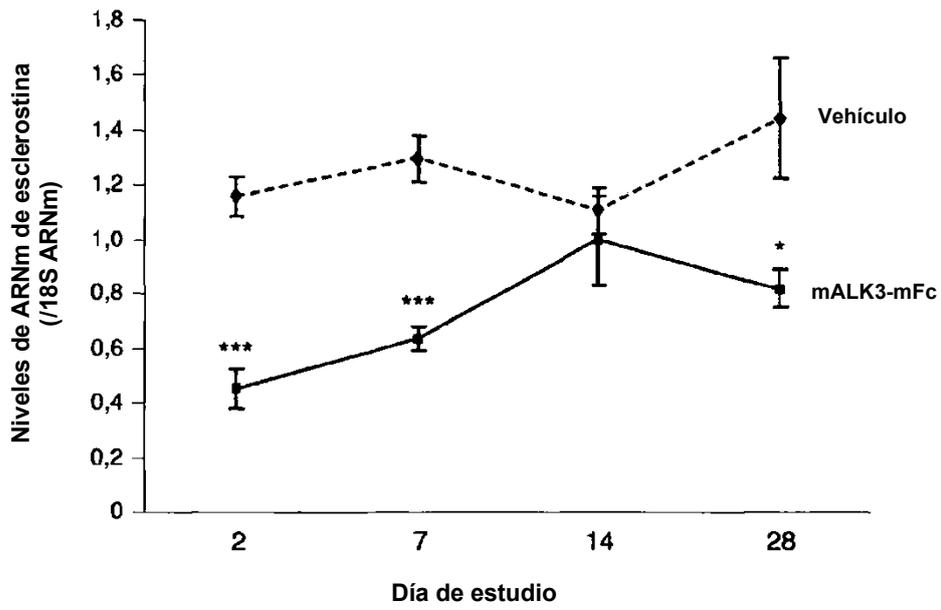


Figura 36. Efecto de hALK3-hFc sobre el volumen del hueso trabecular en ratones

