

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 755**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2007** **PCT/US2007/023217**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2008** **WO08057461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007** **E 07861684 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016** **EP 2087001**

54 Título: **Antagonistas de receptor y ligando de ALK1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

02.11.2006 US 856592 P

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

18.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GRINBERG, ASYA;
KNOFF, JOHN;
KUMAR, RAVINDRA;
PEARSALL, ROBERT SCOTT y
SEEHRA, JASBIR

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 612 755 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 receptor y ligando de ALK1 y usos de los mismos

Antecedentes

La angiogénesis, el procedimiento de formación de nuevos vasos sanguíneos, es crítica en muchos estados fisiológicos normales y anormales. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos y los animales experimentan angiogénesis en situaciones específicas y restringidas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la curación de heridas, desarrollo fetal y embrionario y formación del cuerpo lúteo, endometrio y placenta.

La angiogénesis no deseable o regulada de manera inapropiada tiene lugar en muchos trastornos, en los que el crecimiento endotelial anormal puede ocasionar o puede participar en, el proceso patológico. Por ejemplo, la angiogénesis participa en el crecimiento de muchos tumores. La angiogénesis desregulada ha estado implicada en procesos patológicos tales como artritis reumatoide, retinopatías, hemangiomas y soriasis. Las diversas condiciones patológicas en las que está presente la angiogénesis no regulada han sido clasificadas como enfermedades asociadas a la angiogénesis.

Se cree que la angiogénesis, tanto controlada como no controlada, transcurre de una manera similar. Los vasos sanguíneos capilares están constituidos principalmente por células endoteliales y pericitos, rodeados por una membrana basal. La angiogénesis empieza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que revisten el lumen de los vasos sanguíneos, sobresalen entonces por la membrana basal. Los factores angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar por la membrana basal erosionada. Las células que migran forman un "brote" que sobresale del vaso sanguíneo precursor, donde las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

Los agentes que inhiben la angiogénesis han demostrado ser eficaces en el tratamiento de una variedad de trastornos. Avastin™ (bevacizumab), un anticuerpo monoclonal que se une a Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de una variedad de tumores malignos. Macugen™, un aptámero que se une a VEGF ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad neovascular (húmeda). Los antagonistas de la ruta de señalización SDF/CXCR4 inhiben la neovascularización de los tumores y son eficaces contra el cáncer en modelos de ratones (Guleng et al. Cancer Res. 1 de julio de 2.005; 65 (13): 5.864-71). El ácido isocumarin-2-(8-hidroxi-6-metoxi-1-oxo-1H-2-benzopirán-3-il)propiónico (NM-3) ha completado la evaluación clínica de fase I como un inhibidor de la angiogénesis biodisponible por vía oral. El NM-3 destruye directamente las células tanto endoteliales como tumorales in vitro y es eficaz en el tratamiento de diversos xenoinjertos de tumores humanos en ratones (Agata et al. Cancer Chemother Pharmacol. Diciembre de 2.005; 56 (6): 610-4.). La talidomida y compuestos relacionados han demostrado efectos beneficiosos en el tratamiento del cáncer y aunque el mecanismo molecular de acción no está claro, la inhibición de la angiogénesis parece ser un componente importante del efecto antitumoral (véase, por ej., Dredge et al. Microvasc Res., enero de 2.005; 69 (1-2): 56-63). El éxito de los antagonistas de TNF-alfa en el tratamiento de la artritis reumatoide se atribuye parcialmente a los efectos antiangiogénicos en el tejido articular inflamado (Feldmann et al. Annu Rev Immunol. 2.001; 19: 163-96). Se espera generalmente que los tratamientos antiangiogénicos presenten efectos beneficiosos en otras enfermedades inflamatorias, en particular la soriasis. Aunque muchos agentes antiangiogénicos presentan un efecto sobre la angiogénesis sin tener en cuenta el tejido que está afectado, otros agentes angiogénicos pueden tender a presentar un efecto selectivo del tejido.

Es deseable tener composiciones y métodos adicionales para inhibir la angiogénesis. Estos incluyen métodos y composiciones que pueden inhibir el crecimiento no deseado de vasos sanguíneos, en general o en ciertos tejidos y/o condiciones patológicas.

Resumen

La presente invención se refiere a una proteína de fusión ALK1-Fc que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es al menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos 22-118 de la SEC ID N° 1, en la que la proteína de fusión ALK1-Fc inhibe la angiogénesis estimulada por VEGF, FGF (factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés) y GDF7 (factor de diferenciación de crecimiento, por sus siglas en inglés), para uso en: (a) inhibición de la angiogénesis en un mamífero o (b) tratamiento de la artritis reumatoide en un mamífero.

En una realización más, la invención se refiere a la proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la invención como se definió anteriormente, en la que la proteína de fusión ALK1-Fc inhibe la angiogénesis estimulada por VEGF, FGF y GDF7 en un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM, por sus siglas en inglés).

En una realización más, la invención se refiere a la proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la invención como se definió anteriormente, en la que la proteína de fusión ALK1-Fc se une a GDF5, GDF7 y BMP9 (Proteínas Morfogenéticas Óseas, por sus siglas en inglés) con una KD menor que 1×10^{-7} M y se une a TGFβ-1 con una KD mayor que 1×10^{-6} M.

En una realización más, la invención se refiere a la proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la invención como se definió anteriormente, en la que la porción Fc es una porción Fc de una inmunoglobulina IgG1 humana.

5 En una realización más, la invención se refiere a la proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la invención como se definió anteriormente que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

En una realización más, la invención se refiere a una preparación farmacéutica, que está opcionalmente sustancialmente exenta de pirógeno, que comprende la proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la invención como se definió anteriormente. En dichas realizaciones, la preparación puede ser una formulación farmacéutica oftálmica.

10 En parte, la presente descripción presenta una caracterización de un sistema regulador mediado por cinasa I tipo activina (ALK1) y la función de este sistema en la angiogénesis in vivo. En ciertos aspectos, la descripción proporciona antagonistas de ligandos de ALK-1 y el uso de tales antagonistas como agentes antiangiogénicos. Adicionalmente, la descripción proporciona antagonistas de ALK-1 y el uso de tales antagonistas como agentes antiangiogénicos. Como se describe en la presente memoria, ALK1 es un receptor para el grupo GDF5 de ligandos, 15 que incluye GDF6 y GDF7 y también para el grupo BMP9 de ligandos, que incluye BMP10. Esta descripción demuestra que la señalización mediada por ALK1 y los ligandos descritos anteriormente está implicada en la angiogénesis in vivo y que la inhibición de este sistema regulador presenta un potente efecto antiangiogénico. Así, en ciertos aspectos, la descripción proporciona antagonistas del sistema regulador de ALK1, incluyendo los antagonistas del receptor o uno o más de los ligandos, para uso en la inhibición de la angiogénesis. En ciertos 20 aspectos, la descripción proporciona antagonistas de ligandos de ALK1 para el tratamiento de artritis reumatoide y trastornos asociados a la angiogénesis patológica en el ojo.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona polipéptidos que comprenden una porción de unión del ligando del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de ALK1 ("polipéptidos ECD ALK1") para uso en la inhibición de la angiogénesis. Aunque no se desea estar ligados a ningún mecanismo de acción particular, se espera que dichos 25 polipéptidos actúen uniéndose a ligandos de ALK1 e inhibiendo la capacidad de estos ligandos para interactuar con ALK1 así como otros receptores. En algunas realizaciones, un polipéptido ECD ALK1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos 22-118 de la secuencia de ALK1 humana de la SEC. ID N° 1. Se puede usar un polipéptido ECD ALK1 como una proteína monómera pequeña o en una forma dimerizada (por ejemplo, expresada como una proteína de fusión), en particular para administración local en tejidos tales como el ojo. También se puede fusionar un ECD de ALK1 a una 30 segunda porción polipeptídica para proporcionar propiedades mejoradas, tales como semivida aumentada o mayor facilidad de producción o purificación. Las fusiones a una porción Fc de una inmunoglobulina o unión a un resto polioxietileno (por ejemplo, polietilenglicol) pueden ser útiles en particular para aumentar la semivida del suero del polipéptido ECD ALK1 en la administración sistémica (por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial e intraperitoneal). Como se demuestra en la presente memoria, un polipéptido ALK1-Fc administrado por vía sistémica presenta un potente efecto antiangiogénico en el ojo y también proporciona efectos positivos en modelos de murina de artritis reumatoide. En algunas realizaciones, una proteína de fusión ALK1-Fc comprende un polipéptido con una 35 secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos 22-118 de la SEC. ID N° 1, polipéptido que se fusiona, con o sin un ligador interviniente, a una porción Fc de una inmunoglobulina y en la que la proteína de fusión ALK1-Fc se une a GDF5, GDF7 y BMP9 con una K_D menor que 1×10^{-7} M y se une a TGF β -1 con una K_D mayor que 1×10^{-6} . Se puede seleccionar una porción Fc para que sea apropiada para el organismo. Opcionalmente, la porción Fc es una porción Fc de una IgG1 humana. En una realización preferida, la proteína de fusión ALK1-Fc comprende los aminoácidos 22-118 de la SEC. ID N° 1. Opcionalmente, la proteína de fusión ALK1-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3. 40 Opcionalmente, la proteína de fusión ALK1-Fc es la proteína producida por expresión del ácido nucleico de la SEC. ID N° 4 en una estirpe celular de mamífero, en particular una estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés). Los polipéptidos ECD ALK1 pueden formularse como una preparación farmacéutica que está sustancialmente exenta de pirógeno. La preparación farmacéutica puede prepararse por suministro sistémico (por ej., suministro intravenoso, intraarterial o subcutáneo) o suministro local (por ejemplo, al ojo).

50 En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para la inhibición de la angiogénesis en un mamífero por administración de cualquiera de los polipéptidos ECD ALK1 descritos en general o de manera específica en la presente memoria. En una realización, un método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una proteína de fusión ALK1-Fc, en la que la proteína de fusión ALK1 Fc comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos 22-118 de la SEC. ID N° 1, polipéptido 55 que se fusiona a una porción Fc de una inmunoglobulina y en la que la proteína de fusión ALK1-Fc se une a TGF β -1 con una K_D mayor que 1×10^{-6} . Opcionalmente, la proteína de fusión ALK1-Fc se une a uno o más ligandos de ALK1 seleccionados del grupo que consiste en: GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 y BMP10. Opcionalmente, la proteína de fusión ALK1-Fc presenta una secuencia de la SEC. ID N° 3. El polipéptido ECD ALK1 puede suministrarse de manera local (por ej., al ojo) o por vía sistémica (por ej., por vía intravenosa, por vía intraarterial o por vía subcutánea). En una realización particular, la descripción proporciona un método para inhibir la angiogénesis en el 60 ojo de un mamífero por administración de una proteína ALK1-Fc al mamífero en una posición distal al ojo, por ej.,

por administración sistémica.

Los miembros de la familia BMP/GDF, incluyendo BMP9, BMP10, GDF5, GDF6 y GDF7 se unen a un receptor tipo I y uno tipo II para formar un complejo de señalización funcional. Los sitios de unión para estos receptores son diferentes. También se describen en la presente memoria métodos para tratar artritis reumatoide en un mamífero.

- 5 En cada caso, se puede administrar un agente descrito en la presente memoria junto con un segundo agente que inhibe la angiogénesis.

La descripción también proporciona una formulación farmacéutica oftálmica como se define en las reivindicaciones. La invención encuentra aplicación en métodos de tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis del ojo que comprende administrar a dicho ojo una formulación farmacéutica oftálmica como se define en las
10 reivindicaciones. La formulación puede comprender además uno o más de los siguientes medicamentos: pegaptanib, ranibizumab o un glucocorticoide. En una realización, la formulación está sustancialmente exenta de pirógeno.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos para la cinasa 1 tipo activina, ALK1, humana, (SEC. ID N° 1). El subrayado único muestra el dominio extracelular predicho. El doble subrayado muestra el dominio intracelular. El péptido señal y el dominio transmembrana no están subrayados.

La Figura 2 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de un ADNc de ALK1 humano (SEC. ID N° 2). La secuencia codificadora esta subrayada. La porción que codifica el dominio extracelular lleva doble subrayado.

20 La Figura 3 muestra un ejemplo de una fusión del dominio extracelular de ALK1 humano a un dominio Fc (SEC. ID N° 3). La proteína hALK1-Fc incluye los aminoácidos 22-120 de la proteína ALK1 humana, fusionados en el C terminal a un ligador (subrayado) y una región Fc de IgG1.

La Figura 4 muestra la secuencia de ácidos nucleicos para expresión del polipéptido hALK1-Fc de la SEC. ID N° 3. También se muestra la secuencia de aminoácidos codificada. La secuencia líder se escinde de
25 manera que Asp 22 es el aminoácido N-terminal de la proteína segregada.

La Figura 5 muestra el efecto antiangiogénico de ALK1-Fc de murina ("RAP") y ALK1-Fc humana ("ACE") en un ensayo de formación de tubo de células endoteliales. Todas las concentraciones de RAP y ACE redujeron el nivel de formación de tubos como respuesta a un suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGF, por sus siglas en inglés) a un grado mayor que el control positivo, Endostatina.

30 La Figura 6 muestra el efecto angiogénico de GDF7 en un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM). El efecto de GDF7 es comparable al de VEGF.

La Figura 7 muestra el efecto antiangiogénico de la fusión de ALK1-Fc humana en el ensayo CAM. hALK1-Fc inhibe la angiogénesis estimulada por VEGF, FGF y GDF7.

35 La Figura 8 muestra efectos antiangiogénicos comparativos de ALK1-Fc (mALK1-Fc) de murina, hALK1-Fc, un anticuerpo monoclonal anti-ALK1 comercialmente disponible (mAb Anti-ALK1) y un anticuerpo monoclonal anti-VEGF de neutralización, comercialmente disponible. El efecto antiangiogénico de las construcciones ALK1-Fc es comparable a los efectos del anticuerpo anti-VEGF.

La Figura 9 muestra los efectos antiangiogénicos de hALK1-Fc y el anticuerpo anti-VEGF in vivo. hALK1-Fc y anti-VEGF presentaron efectos comparables sobre la angiogénesis en el ojo cuando se midió por el
40 ensayo de microbolsa corneal de ratón.

La Figura 10 muestra los efectos de mALK1-Fc en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA, por sus siglas en inglés) de murina de la artritis reumatoide. La gráfica muestra valoraciones artríticas de grupo medias determinadas durante el periodo de observación de 42 días en los ratones con artrosis DBA/1 machos, inducida por colágeno. RAP-041 es mALK1-Fc. Avastin™ es el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab.
45

Descripción detallada

1. Resumen

50 ALK1 es un receptor de superficie celular tipo I para la superfamilia TGF- β de ligandos y también se conoce como ACVRL1 y ACVRLK1. Se ha implicado ALK1 como receptor para TGF- β 1, TGF- β 3 y BMP-9 (Marchuk et al., Hum Mol Genet. 2.003; Brown et al., J Biol Chem. 1 de julio de 2.005; 280 (26): 25.111-8).

En ratones, las mutaciones de pérdida de función en ALK1 conducen a una variedad de anomalías en la

vasculatura que se desarrolla (Oh et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 2.000, 97, 2.626-2.631; Urness et al., Nat. Genet. 2.000, 26, 328-331).

En seres humanos, las mutaciones en pérdida de función en ALK1 se asocian a telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT, por sus siglas en inglés o síndrome de Osler-Rendu-Weber), en que los pacientes desarrollan malformaciones arteriovenosas que crean un flujo directo (comunicación) de una arteria a una vena (derivación arteriovenosa), sin un lecho capilar interviniente. Los síntomas típicos de los pacientes con HHT incluyen epistaxis recurrente, hemorragia gastrointestinal, telangiectasas cutánea y mucocutánea y malformaciones arteriovenosas (AVM, por sus siglas en inglés) en la vasculatura pulmonar, cerebral o hepática.

Las publicaciones recientes de David et al. (Blood. 1 de marzo de 2.007; 109 (5):1.953-61.) y Scharpfenecker et al. (J Cell Sci. 15 de marzo de 2.007; 120 (Pt 6): 964-72) concluyen que BMP9 y BMP10 activan ALK1 en células endoteliales y que la consecuencia de esta activación es inhibir la proliferación y la migración de células endoteliales. Estos efectos se oponen directamente a los de factores pro-angiogénicos tales como VEGF. Así, estas publicaciones concluyen que BMP9 y BMP10 son factores antiangiogénicos ellos mismos y además, que la activación de ALK1 presenta un efecto antiangiogénico. Por el contrario, la presente descripción demuestra que los antagonistas, en vez de los agonistas, de BMP9 y BMP10 presentan efectos antiangiogénicos.

La descripción se refiere al descubrimiento de que los polipéptidos que comprenden una porción del dominio extracelular de ALK1 ("polipéptidos ECD ALK1") pueden usarse para inhibir la angiogénesis in vivo, incluyendo angiogénesis independiente de VEGF y angiogénesis que está mediada por múltiples factores angiogénicos, incluyendo VEGF, FGF y PDGF. En parte, la descripción proporciona la identidad de ligandos de alta afinidad, fisiológicos, para ALK1 y demuestra que los polipéptidos ECD ALK1 inhiben la angiogénesis. Los datos demuestran que un polipéptido ECD ALK1 puede ejercer un efecto antiangiogénico incluso en el caso en el que el polipéptido ECD ALK1 no presente unión significativa a TGF- β 1. Por otra parte, los polipéptidos ECD ALK1 inhiben la angiogénesis que es estimulada por muchos factores pro-angiogénicos diferentes, incluyendo VEGF, FGF y GDF7. Así, la descripción proporciona una descripción de un sistema regulador de ALK1, en el que ALK1 es un receptor para el grupo GDF5 de ligandos, que incluye GDF6 y GDF7 y también para el grupo BMP9 de ligandos, que incluye BMP10, con diferentes afinidades para los dos grupos de ligandos. Además, la descripción demuestra que la señalización mediada por ALK1 y los ligandos descritos anteriormente es pro-angiogénica in vivo y que la inhibición de este sistema regulador presenta un potente efecto antiangiogénico in vivo. Así, en ciertos aspectos, la descripción proporciona antagonistas del sistema regulador de ALK1, incluyendo los antagonistas del receptor o uno o más de los ligandos, para uso en inhibición de angiogénesis, incluyendo tanto angiogénesis dependiente de VEGF como angiogénesis independiente de VEGF. Sin embargo, se debería observar que se espera que los anticuerpos dirigidos a ALK1 presenten diferentes efectos de un polipéptido ECD ALK1. Se esperaría que un anticuerpo pan-neutralizante contra ALK1 (uno que inhibe la unión de todos los ligandos fuertes y débiles) inhibiera la señalización de dichos ligandos a través de ALK1 pero no se esperaría que inhibiera la capacidad de dichos ligandos para señalizar a través de otros receptores (por ej., BMPR1a, BMPR1b, BMPRII en el caso de GDF5-7 y BMP9-10 y TBR1 y TBR2 en el caso de TGF β). Por otra parte, se esperaría que un polipéptido ECD ALK1 inhibiera a todos los ligandos a los que se une estrechamente, incluyendo, para una construcción tal como la mostrada en los Ejemplos, GDF5-7 y BMP9-10, pero no afectaría a los ligandos a los que se une de manera débil, tales como TGF- β . Así, mientras un anticuerpo pan-neutralizante contra ALK1 bloquearía la señalización de BMP9 y TGF- β por ALK1 no bloquearía la señalización de BMP9 y TGF- β por otro receptor y mientras un polipéptido ECD ALK1 puede inhibir la señalización de BMP9 por todos los receptores (incluso receptores distintos de ALK1) no se esperaría que inhibiera la señalización de TGF- β por cualquier receptor, incluso ALK1.

Las proteínas descritas en la presente memoria son las formas humanas, a menos que se especifique de otro modo. Las referencias del Genbank para las proteínas son como sigue: GDF5 humana, CAA56874; GDF6 humana, AAH43222; GDF7 humana, NP_878248; BMP9 humana, Q9UK05; BMP10 humana, O95393; DAN humana, BAA92265. Las secuencias de ALK1 se explican en las Figuras 1-5.

Secuencia de aminoácidos de Dan humana (SEC. ID N° 10) (Genbank BAA92265):

MLRVLVGAVL PAMLLAAPPP INKLALFPDK SAWCEAKNIT QIVGHSGCEA KSIQNRACLG
 QCFSYSVPNT FPQSTESLVH CDSCMPAQSM WEIVTLECPG HEEVPRVDKL VEKILHCSCQ
 ACGKEPSHEG LSVYVQGEDG PGSQPGTHPH PHPHPHPGGQ TPEPEDPPGA PHTEEEGAED

Se espera que la proteína Dan madura corresponda a los aminoácidos 17-180. El dominio de nudo de cisteína conservado de Dan corresponde a los aminoácidos 21-125 (subrayados).

Secuencia de ADNc de Dan humana (SEC. ID N° 11) (Genbank BC012037):

```

gccgagcctc ctggggcgcc cggggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg
ggcgcgcgcg ggtctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctggtg ggggctgtcc
tccttgccat gctactggct gcccaccac ccaccaacaa gctggcactg ttcccagata
agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca ccagatcgt gggccacagc ggctgtgagg
ccaagtccat ccagaacagg gcgtgcctag gacagtgcct cagctacagc gtccccaaca
ccttcccaca gtccacagag tccttggttc actgtgactc ctgcatgcca gccagtgcca
tgtgggagat tgtgacgctg gagtgcctcg gccacgagga ggtgcccagg gtggacaagc
tggtggagaa gatcctgcac tgtagctgcc aggcctgcgg caaggagcct agtcacgagg
ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggacg ggccgggata ccagcccggc acccaccctc
acccccatcc ccacccccat cctggcgggc agacccctga gcccgaggac ccccttgggg
ccccccacac agagggaagag ggggctgagg actgaggccc ccccaactct tcctcccctc
tcacccccct gtggaatggt ggggtctact ctctggggaa gtcaggggag aagctgaagc
ccccctttgg cactggatgg acttggtctc agactcggac ttgaatgctg cccggttgcc
atggagatct gaagggggcg ggttagagcc aagctgcaca atttaataata ttcaagagtg
gggggaggaa gcagaggtct tcagggtctt ttttttgggg ggggggtggt ctcttctgt
ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggaggg ggaggaagtt ggtgagcca ttgagtgtg
ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggctc ctgggggtgc agatggtaact
gctgaggtcc cgggcttagt gtgagcatct tgccagcctc aggcttgagg gagggtggg
ctagaaagac cactggcaga aacaggaggg tccggcccca caggtttccc caaggcctct
caccccaact cccatctcca gggaagcgtc gcccagtggt cactgaagtg gccctccctc
agcggagggg tttgggagtc aggcctgggc aggacctgc tgactcgtgg cgcgggagct
gggagccagg ctctccgggc cttctcttgg cttccttggc ttgctggtg ggggaagggg
aggaggggaa gaaggaaagg gaagagtctt ccaaggccag aaggaggggg acaaccccc
aagaccatcc ctgaagacga gcatccccct cctctccctg ttagaaatgt tagtgccccg
cactgtgccc caagtcttag gccccccaga aagctgtcag agccggccgc cttctccctt
ctcccaggga tgctctttgt aaatatcgga tgggtgtggg agtgagggtg tacctccctc
gccccaaagt tccagaggcc ctaggcgga tgggtctcgt gaacctcgag gaactccagg

acgaggaggga catgggactt gcgtggacag tcagggttca cttgggctct ctctagctcc
ccaattctgc ctgcctctc cctcccagct gcactttaac cctagaagggt ggggacctgg
ggggagggac agggcaggcg ggcccatgaa gaaagccct cgttgcccag cactgtctgc
gtctgctctt ctgtgcccag ggtggtgcc agcccactgc ctctgctcg ggtggtcg
gcctcctgg ctgttgccag gcgggcttct ggagcttgc accattggac agtctccctg
atggaccctc agtcttctca tgaataaatt cttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

- 5 La secuencia codificadora para precursor de DAN corresponde a los ácidos nucleicos 93-635. La secuencia codificadora para la proteína DAN madura corresponde a los ácidos nucleicos 141-632. La secuencia codificadora para la porción de nudo de cisteína conservada de DAN corresponde a los ácidos nucleicos 153-467.

10 Los términos usados en esta memoria descriptiva presentan en general sus significados ordinarios en la técnica, en el contexto de esta descripción y en el contexto específico donde se use cada término. Ciertos términos se discuten en la memoria descriptiva, para proporcionar guía adicional al médico en la descripción de las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria y cómo prepararlas y usarlas. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se use el término.

2. Polipéptidos ALK1 solubles.

15 Las proteínas ALK1 que se encuentran en la naturaleza son proteínas transmembrana, con una porción de la proteína colocada fuera de la célula (la porción extracelular) y una porción de la proteína colocada en el interior de la célula (la porción intracelular). Aspectos de la presente descripción incluyen polipéptidos que comprenden una porción del dominio extracelular de ALK1.

20 El término "polipéptido ECD ALK1" se destina a referirse a un polipéptido que consiste en, o que comprende, una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular de un polipéptido ALK1 que se encuentra en la naturaleza, incluyendo o excluyendo cualquier secuencia señal y N-terminal de la secuencia para la secuencia señal, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 33 por ciento idéntica a un dominio extracelular de un polipéptido ALK1 que se encuentre en la naturaleza y opcionalmente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de un dominio extracelular de un polipéptido ALK1 que se encuentre en la naturaleza, como se ejemplifica por la región de nudo de cisteína de los aminoácidos 34-95 de la SEC. ID N° 1 o el nudo de cisteína más aminoácidos adicionales en el N- y C-terminal del dominio extracelular, tales como los aminoácidos 22-118 de la SEC. ID N° 1. Asimismo, un polipéptido ECD ALK1 puede comprender un polipéptido que esté codificado por los nucleótidos 100-285 de la SEC. ID N° 2 o variantes silenciosas del mismo o ácidos nucleicos que se hibriden al complementario del mismo en condiciones de hibridación rigurosas (en general, tales condiciones se conocen en la técnica pero, por ejemplo, pueden implicar hibridación en formamida al 50% v/v, SSC x 5, agente bloqueante al 2% p/v, N-lauroilsarcosina al 0,1%, SDS al 0,3% a 65°C durante la noche y lavando en, por ejemplo, SSC x 5 a aproximadamente 65 °C). Adicionalmente, un polipéptido ECD ALK1 puede comprender un polipéptido que esté codificado por los nucleótidos 64-384 de la SEC.

ID N° 2 o variantes silenciosas de los mismos o ácidos nucleicos que se hibriden al complementario de los mismos en condiciones de hibridación rigurosas (en general, tales condiciones se conocen en la técnica pero, por ejemplo, pueden implicar hibridación en formamida al 50% v/v, SSC x 5, agente bloqueante al 2% p/v, N-lauroilsarcosina al 0,1%, SDS al 0,3% a 65°C durante la noche y lavando en, por ejemplo, SSC x 5 a aproximadamente 65°C). El término "polipéptido ECD ALK1" de acuerdo con esto incluye porciones extracelulares aisladas de polipéptidos ALK1, variantes de los mismos (incluyendo variantes que comprenden, por ejemplo, no más de 2, 3, 4, 5 ó 10 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la secuencia que corresponde a los aminoácidos 22-118 de la SEC. ID N° 1 y que incluyen variantes que comprenden no más de 2, 3, 4, 5 ó 10 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la secuencia que corresponde a los aminoácidos 34-95 de la SEC. ID N° 1), fragmentos de los mismos y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de lo precedente, pero en cada caso preferiblemente cualquiera de los polipéptidos ECD ALK1 anteriores retendrá una afinidad sustancial para uno o más de GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 o BMP10. El término "polipéptido ECD ALK1" se destina de manera explícita a excluir cualquier polipéptido ALK1 que se encuentre en la naturaleza, de longitud total. En general, se diseñará que un polipéptido ECD ALK1 sea soluble en disoluciones acuosas a temperaturas, niveles de pH y osmolaridad, biológicamente relevantes.

Se describieron anteriormente polipéptidos ECD ALK1 que comparten un grado especificado de identidad o similitud de secuencias para un polipéptido ALK1 que se encuentre en la naturaleza. Para determinar la identidad en porcentaje de dos secuencias de aminoácidos, se alinean las secuencias para fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en uno o ambos de un primer y un segundo aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos para alineamiento óptimo y se pueden rechazar secuencias no homólogas para fines de comparación). Los restos aminoácido en las posiciones correspondientes de los aminoácidos se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto aminoácido que la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente memoria "identidad" de aminoácidos es equivalente a "homología" de aminoácidos). La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que se requiere introducir para alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación de la identidad y la similitud en porcentaje entre dos secuencias puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed. Oxford University Press, Nueva York, 1.988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1.993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1.994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1.987 y Sequence Analysis Primer, eds., Gribskov, M. and Devereux, J., M Stockton Press, Nueva York, 1.991).

En una realización, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman and Wunsch (J Mol. Biol. (48): 444-453 (1.970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>). En una realización específica, se usan los siguientes parámetros en el programa GAP: una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250 y un peso del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otra realización más, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete informático GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12 (1): 387 (1.984)) (disponible en <http://www.gcg.com>). Los parámetros ejemplares incluyen usar una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de las longitudes de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. A menos que se especifique de otro modo, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se tiene que determinar usando el programa GAP usando una matriz Blosum 62, un peso de GAP de 10 y un peso de longitudes de 3 y si dicho algoritmo no puede computar el porcentaje de identidad deseado, se debería seleccionar una alternativa adecuada descrita en la presente memoria.

En otra realización, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de E. Myers y W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1.989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización por la longitud de los huecos de 12 y penalización por huecos de 4.

Otra realización para determinar el mejor alineamiento total entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci., 6: 237-245 (1.990)). En un alineamiento de secuencias, las secuencias pregunta y encontrada son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencias global se presenta en términos de porcentaje de identidad. En una realización, la identidad de la secuencia de aminoácidos se realiza usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci., 6: 237-245 (1.990)). En una realización específica, los parámetros empleados para calcular el porcentaje de identidad y similitud de un alineamiento de aminoácidos comprenden: Matriz =PAM 150, k-tupla=2, Penalización por desemparejamiento=1, Penalización por unión =20, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación límite=1, Penalización por huecos=5 y Penalización por tamaño de huecos=0,05.

En algunas realizaciones, los polipéptidos ECD ALK1 comprenden una porción extracelular de una proteína ALK1 que se encuentra en la naturaleza tal como una secuencia de la SEC. ID N° 1 y preferiblemente una porción de

unión del ligando del dominio extracelular de ALK1. En algunas realizaciones, un polipéptido ALK1 soluble comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 22-118 de la SEC. ID N° 1. En algunas realizaciones, un polipéptido ALK1 extracelular truncado comprende al menos 30, 40 ó 50 aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos de una porción extracelular de la SEC. ID N° 1.

En realizaciones preferidas, un polipéptido ECD ALK1 se une a uno o más de GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 y BMP10. Opcionalmente, el polipéptido ALK1 no muestra unión sustancial a TGF- β 1 o TGF- β 3. La unión puede ser evaluada usando proteínas purificadas en disolución o en un sistema de resonancia plasmónica superficial, tal como un sistema Biacore™. Los polipéptidos ALK1 solubles preferidos presentarán una actividad antiangiogénica. Los bioensayos para actividad inhibitoria de la angiogénesis incluyen el ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM), el ensayo de microbolsa corneal de ratón, un ensayo para medir el efecto de administrar proteínas aisladas o sintetizadas en tumores implantados. El ensayo CAM es descrito por O'Reilly, et al. en "Angiogenic Regulation of Metastatic Growth" Cell, vol. 79 (2), 1 de octubre de 1.994, págs. 315-328. En resumen, se separaron embriones de pollo de 3 días con yemas intactas del huevo y se pusieron en una placa de petri. Después de 3 días de incubación, se aplicó un disco de metilcelulosa que contenía la proteína para ensayar al CAM de embriones individuales. Después de 48 horas de incubación, se observaron los embriones y los CAM para determinar si había sido inhibido el crecimiento endotelial. El ensayo de microbolsa corneal de ratón implica implantar un gránulo que contiene factor de crecimiento, junto con otro gránulo que contiene el inhibidor de crecimiento endotelial sospechado, en la córnea de un ratón y observar el patrón de capilares que se elaboran en la córnea. Se describen otros ensayos en los Ejemplos.

Los polipéptidos ECD ALK1 pueden producirse eliminando la cola citoplásmica y la región transmembrana de un polipéptido ALK1. Alternativamente, se puede inactivar el dominio transmembrana por supresión o por sustitución de los restos aminoácido normalmente hidrófobos que comprenden un dominio transmembrana con unos hidrófilos. En cualquier caso, se crea un perfil de hidropatía sustancialmente hidrófilo que reducirá la afinidad lipídica y mejorará la solubilidad acuosa. La supresión del dominio transmembrana se prefiere sobre la sustitución con restos aminoácido hidrófilos debido a que evita introducir epítomos potencialmente inmunogénicos.

Los polipéptidos ECD ALK1 pueden incluir adicionalmente cualquier número de secuencias líder conocidas en el N terminal. Dicha secuencia permitiría que los péptidos se expresen y se fijan como objetivo para la ruta de secreción en un sistema eucariota. Véase, por ej., Ernst et al., Patente de EE.UU. N° 5.082.783 (1.992). Alternativamente, puede usarse una secuencia señal de ALK1 natural para efectuar extrusión de la célula. Las posibles secuencias líder incluyen líderes naturales, tPa y melitina de abeja (SEC ID Nos. 7-9, respectivamente). El tratamiento de los péptidos señal puede variar dependiendo de la secuencia líder escogida, el tipo de célula usado y las condiciones de cultivo, entre otras variables, y por lo tanto los sitios de partida N-terminal reales para polipéptidos ECD ALK1 maduros, incluyendo el de la SEC. ID N° 5, pueden desplazarse por 1-5 aminoácidos en la dirección N-terminal o C-terminal.

En algunas realizaciones, la presente descripción considera mutaciones específicas de los polipéptidos ALK1 para modificar la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como sitios de glucosilación ligados a O o ligados a N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación ligados a asparagina comprenden en general una secuencia de tripéptidos, asparagina-X-treonina (o asparaginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconozca de manera específica por enzimas de glucosilación celular apropiadas. La modificación también se puede realizar por la adición de, o sustitución por, uno o más restos serina o treonina para la secuencia del polipéptido ALK1 de tipo natural (para sitios de glucosilación ligados a O). Una variedad de sustituciones o supresiones de aminoácidos en una o las dos de las posiciones de los aminoácidos primero o tercero de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o supresión de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado no glucosilación en la secuencia de tripéptidos modificada. Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en un polipéptido ALK1 es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ALK1. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o los azúcares pueden unirse 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 tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amido de glutamina. Estos métodos se describen en la patente internacional WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1.987 y en Aplin y Wriston (1.981) CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306, incorporado como referencia en la presente memoria. La eliminación de uno o más restos carbohidrato presentes en un polipéptido ALK1 puede llevarse a cabo de manera química y/o de manera enzimática. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ALK1 al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar ligador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), al tiempo que sale la secuencia de aminoácidos intacta. La desglucosilación química es descrita además por Hakimuddin et al. (1.987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y por Edge et al. (1.981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de restos carbohidrato en polipéptidos ALK1 puede conseguirse por el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas como describe Thotakura et al. (1.987) Meth. Enzymol. 138: 350. La secuencia de un polipéptido ALK1 puede ajustarse, cuando sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y planta, pueden todas introducir diferentes

patrones de glucosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ALK1 para uso en seres humanos se expresarán en una estirpe celular de mamífero que proporcione glucosilación apropiada, tal como estirpes celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que sean útiles también otras estirpes celulares de expresión de mamíferos, estirpes celulares de levaduras con enzimas de glucosilación logradas y células de insectos.

Esta descripción considera además un método para generar mutantes, en particular series de mutantes combinatorios de un polipéptido ALK1, así como mutantes de truncamiento; las mezclas de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El fin de la identificación sistemática de tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptido ALK1 que puedan actuar como agonistas o antagonistas, o alternativamente, que posean nuevas actividades todas juntas. Se proporciona una variedad de ensayos de identificación sistemática a continuación y dichos ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, se puede identificar sistemáticamente una variante de polipéptido ALK1 por la capacidad para unirse a un ligando de ALK1, para evitar la unión de un ligando de ALK1 a un polipéptido ALK1 o para interferir con la señalización ocasionada por un ligando de ALK1. La actividad de un polipéptido ALK1 o sus variantes también pueden ensayarse en un ensayo basado en células o in vivo, en particular cualquiera de los ensayos descritos en los Ejemplos.

Se pueden generar variantes de procedencia combinatoria que presenten una potencia selectiva o generalmente aumentada con respecto a un polipéptido ECD ALK1 que comprende un dominio extracelular de un polipéptido ALK1 que se encuentre en la naturaleza. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que presenten semividas en suero drásticamente diferentes de las que corresponden a un polipéptido ECD ALK1 de tipo natural. Por ejemplo, la proteína modificada puede hacerse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procedimientos que den como resultado la destrucción de, o la eliminación de otro modo o inactivación de un polipéptido ECD ALK1 natural. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para modificar los niveles de polipéptido ECD ALK1 por modulación de la semivida de los polipéptidos ALK1. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptidos ECD ALK1 recombinantes en el paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden realizar mutaciones en el ligador (si hay) y/o la porción Fc para modificar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifiquen una biblioteca de polipéptidos que incluyan cada uno al menos una porción de secuencias de polipéptidos ALK1 potenciales. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse de manera enzimática en secuencias génicas de manera que el conjunto degenerado de secuencias de nucleótidos de polipéptidos ALK1 potenciales se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como una serie de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para visualizar fagos).

Hay muchas maneras por las cuales la biblioteca de variantes de ECD de ALK1 potenciales puede generarse 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 ligarse los genes sintéticos después a un vector apropiado para expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1.983) Tetrahedron 39: 3; Itakura et al., (1.981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. ed., Macromolecules, AG Walton, Amsterdam: Elsevier págs. 273-289; Itakura et al., (1.984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1.984) Science 198:1.056; Ike et al., (1.983) Nucleic Acid Res. 11: 477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1.990) Science 249: 386-390; Roberts et al., (1.992) PNAS USA 89: 2.429-2.433; Devlin et al., (1.990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1.990) PNAS USA 87: 6.378-6.382; así como las patentes de EE.UU. N°: 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Alternativamente, pueden utilizarse otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar y aislar variantes de polipéptidos ALK1 de una biblioteca por identificación sistemática usando, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina y similares (Ruf et al., (1.994) Biochemistry 33: 1.565-1.572; Wang et al., (1.994) J. Biol. Chem. 269: 3.095-3.099; Balint et al., (1.993) Gene 137: 109-118; Grodberg et al., (1.993) Eur. J. Biochem. 218: 597-601; Nagashima et al., (1.993) J. Biol. Chem. 268: 2.888-2.892; Lowman et al., (1.991) Biochemistry 30:10.832-10.838 y Cunningham et al., (1.989) Science 244: 1.081-1.085), por mutagénesis de barrido de ligador (Gustin et al., (1.993) Virology 193: 653-660; Brown et al., (1.992) Mol. Cell Biol. 12:2.644-2.652; McKnight et al., (1.982) Science 232:316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1.986) Science 232:613); por mutagénesis PCR (Leung et al., (1.989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) o por mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1.992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY y Greener et al., (1.994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). Mutagénesis de barrido de ligador, en particular en un ajuste combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ALK1.

Se conoce una amplia variedad de técnicas en la técnica para identificar sistemáticamente productos génicos de bibliotecas combinatorias realizadas por mutaciones y truncaciones puntuales y, para ese asunto, para identificar sistemáticamente bibliotecas de ADNc para productos génicos con una cierta propiedad. Dichas técnicas serán adaptables en general para una rápida identificación sistemática de las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos ALK1. Las técnicas más extensamente usadas para identificación

sistemática de bibliotecas génicas grandes comprenden típicamente clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento relativamente fácil del vector que codifique el gen cuyo producto fue detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión de ligando de ALK1 y ensayos de señalización de células mediada por ligando.

En algunas realizaciones, los polipéptidos ECD ALK1 de la descripción pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté presente de manera natural en los polipéptidos ALK1. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ECD ALK1 modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o mono-sacárido y fosfatos. Los efectos de tales elementos no aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ECD ALK1 pueden ensayarse como se describe en la presente memoria para otras variantes de polipéptidos ECD ALK1. Cuando se produce un polipéptido ECD ALK1 en células por escisión de una forma naciente del polipéptido ALK1, también puede ser importante el tratamiento postraduccionales para corregir el plegamiento y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) presentan una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y pueden elegirse para asegurar la correcta modificación y tratamiento de los polipéptidos ALK1.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ECD ALK1 incluyen proteínas de fusión con al menos una porción de los polipéptidos ECD ALK1 y uno o más dominios de fusión. Ejemplos conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humano. Puede seleccionarse un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para el fin de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía por afinidad, tales como resinas glutatión-, amilasa- y níquel- o cobalto – conjugadas. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de “estuche”, tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QiAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ECD ALK1. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ej., GFP) así como “etiquetas de epítipo”, que son normalmente secuencias peptídicas cortas para las que hay disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipos conocidas para las que hay fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen etiquetas FLAG, hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión presentan un sitio de escisión de proteasa, tal como para Factor Xa o Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo se liberen las proteínas recombinantes de ahí. Las proteínas liberadas pueden aislarse después del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, se fusiona un polipéptido ECD ALK1 con un dominio que estabiliza el polipéptido ALK1 in vivo (un dominio “estabilizador”). Por “estabilización” se quiere decir cualquier cosa que incremente la semivida en suero, sin tener en cuenta si esto es debido a destrucción disminuida, remoción disminuida por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio intervalo de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) de dominios y dominios funcionales.

Como un ejemplo específico, la presente descripción proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ALK1 fusionado a un dominio Fc (por ej., la SEC. ID N° 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPV

PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHN (A) HYTQKSL

SLSPGK*

Opcionalmente, el dominio Fc presenta una o más mutaciones en 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, mutación Asp-265) presenta capacidad reducida para unirse al receptor de Fcγ respecto a un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) presenta capacidad aumentada de unión al receptor Fc relacionado con MHC de clase I (FcRN) respecto a un dominio Fc de tipo natural.

Se entiende que pueden disponerse diferentes elementos de las proteínas de fusión de cualquier manera que sea

consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ECD ALK1 puede colocarse en el C-terminal para un dominio heterólogo, o alternatively, puede colocarse un dominio heterólogo en el C-terminal para un polipéptido ECD ALK1. El dominio del polipéptido ECD ALK1 y el dominio heterólogo requieren no ser adyacentes en una proteína de fusión y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en el C- o N-terminal para cualquier dominio o entre los dominios.

Como se usa en la presente memoria, el término, "región Fc de la inmunoglobulina" o simplemente "Fc" se entiende que significa la porción carboxilo terminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferiblemente una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. Por ejemplo, una región Fc de la inmunoglobulina puede comprender: 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3 o 5) una combinación de dos o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización preferida, la región Fc de la inmunoglobulina comprende al menos una región bisagra de inmunoglobulina un dominio CH2 y un dominio CH3 y preferiblemente carece del dominio CH1.

En una realización, la clase de inmunoglobulina de la que procede la región constante de cadena pesada es IgG (Igy) (subclases γ 1, 2, 3 ó 4). Se pueden usar otras clases de inmunoglobulina, IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ige) e IgM (Igm). La elección de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina apropiada se discute con detalle en las patentes de EE.UU. Nº 5.541.087 y 5.726.044. La elección de secuencias de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, particulares, de ciertas clases y subclases de inmunoglobulina para conseguir un resultado particular se considera que está dentro del alcance del experto en la materia. La porción de la construcción de ADN que codifica la región Fc de la inmunoglobulina comprende preferiblemente al menos una porción de un dominio bisagra y preferiblemente al menos una porción de un dominio CH₃ de Fc y o el dominio homólogo en cualquiera de IgA, IgD, IgE o IgM.

Además, se considera que la sustitución o supresión de aminoácidos dentro de las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina puede ser útil en la práctica de los métodos y las composiciones descritas en la presente memoria. Un ejemplo sería introducir sustituciones de aminoácidos en la región CH2 superior para crear una variante de Fc con afinidad reducida por receptores Fc (Cole et al. (1.997) J. Immunol. 159:3.613).

En algunas realizaciones, la presente descripción prepara formas aisladas y/o purificadas disponibles de los polipéptidos ECD ALK1, que son aislados de, o están sustancialmente exentos de otro modo de (por ej., al menos 80%, 90%, 95%, 97% o 99% exentos de), otras proteínas y/u otra especie polipeptídica ECD ALK1. Se producirán en general polipéptidos ALK1 por expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

En algunas realizaciones, la descripción incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ALK1 solubles que comprenden la secuencia codificadora para una porción extracelular de una proteína ALK1. En realizaciones adicionales, esta descripción también pertenece a una célula huésped que comprende tales ácidos nucleicos. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la presente descripción puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ej., usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la materia. De acuerdo con esto, algunas realizaciones de la presente descripción pertenecen además a métodos para producir los polipéptidos ECD ALK1. Se ha establecido que una proteína de fusión ALK1-Fc explicada en la SEC. ID Nº 3 y expresada en células CHO presenta una potente actividad anti-angiogénica.

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ALK1.

También se describen en la presente memoria ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ALK1 (por ej., polipéptidos ECD ALK1), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en la presente memoria. Por ejemplo, la SEC. ID Nº 2 codifica el polipéptido precursor de ALK1 humano que se encuentra en la naturaleza, mientras que la SEC. ID Nº 4 codifica el precursor de un dominio extracelular de ALK1 fusionado a un dominio Fc de IgG1. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Se pueden usar estos ácidos nucleicos, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ALK1 o como agentes terapéuticos directos (por ej., en una hebra complementaria, ARNi o propuesta de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos objeto que codifican los polipéptidos ALK1 incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEC ID Nº 2 ó 4. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren por una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la SEC. ID Nº 2 ó 4. Un experto en la materia apreciará que las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a la SEC. ID Nº 2 ó 4 y las variantes de la SEC ID Nº 2 ó 4 también están dentro del alcance de esta descripción. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácidos nucleicos de la descripción pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una

secuencia de nucleótidos heteróloga o en una biblioteca de ADN.

Los ácidos nucleicos de la descripción también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en la SEC. ID N° 2 ó 4, secuencia complementaria de la SEC ID N° 2 ó 4 o fragmentos de la misma. Como se discutió anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que activan la hibridación de ADN se pueden variar. Un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que activan la hibridación de ADN pueden variarse. Por ejemplo, se podía realizar la hibridación a cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) x 6,0 a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de SSC x 2,0 a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente SSC x 2,0 a 50°C a una alta rigurosidad de aproximadamente SSC x 0,2 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 variarse o la temperatura o concentración de sal puede mantenerse constante mientras se cambia la otra variable. En una realización, la descripción proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de SSC x 6 a temperatura ambiente seguido por un lavado en SSC x 2 a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se explica en las SEC ID N° 2 ó 4 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, se designa un número de aminoácidos por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o lo sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de las secuencias de ADN que conducen a cambios en las secuencias de los aminoácidos de las proteínas objeto existirán entre células de mamífero. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie determinada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas esas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta descripción.

Los ácidos nucleicos recombinantes de la descripción pueden ligarse de manera operable a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán apropiadas en general para la célula huésped usada para 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 activadoras, secuencias líder o señal, sitios de unión de ribosomas, secuencias de comienzo y terminación transcripcional, secuencias de comienzo y terminación de traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Los activadores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica están considerados por la descripción. Los activadores pueden ser activadores que se encuentren en la naturaleza o activadores híbridos que combinen elementos de más de un activador. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

El ácido nucleico objeto puede proporcionarse en un vector de expresión que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido ALK1 y ligarse de manera operable a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ALK1. De acuerdo con eso, el término secuencia reguladora incluye activadores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1.990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controla la expresión de una secuencia de ADN cuando se liga de manera operable a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifiquen un polipéptido ALK1. Dichas secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los activadores tempranos y tardíos de SV40, activador tet, activador temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, activadores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, activador T7 cuya expresión se dirige por polimerasa ARN T7, el operador principal y regiones activadoras de fago lambda, las regiones de control para proteína de recubrimiento fd, el activador para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los activadores de fosfatasa ácida, por ej., Pho5, los activadores de los factores de apareamiento α de levaduras, el activador polihedro del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y varias combinaciones de los mismos. Se debería entender que el diseño del vector de expresión puede depender de dichos factores como la elección de la célula huésped que se tiene que transformar y/o el tipo de proteína deseado que se tiene que expresar. Además, el número de copia del vector, la capacidad para controlar ese número de copia y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores de antibióticos, también deberían considerarse.

Un ácido nucleico recombinante incluido en la descripción puede producirse por ligadura del gen clonado, o una

porción del mismo, a un vector adecuado para expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, especie aviar, insecto o mamífero) o ambos. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ALK1 recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en las bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores procedentes 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 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 resistencia a fármacos en células tanto procariotas como eucariotas. Alternativamente, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o virus Epstein-Barr (pHEBo, procedente de pREP y p205) para expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluyendo retroviral) a continuación en la descripción de sistemas de suministro de tratamiento génico. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto 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, 2.001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes por el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores procedentes de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores procedentes de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores procedentes de pBlueBac (tales como el β -gal que contiene pBlueBac III).

Se puede diseñar un vector para producción de los polipéptidos ALK1 objeto en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, se pueden usar las construcciones génicas objeto para ocasionar la expresión de los polipéptidos ALK1 objeto en células propagadas en el cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

Esta descripción también pertenece a una célula huésped transfectada con un gen recombinante incluyendo una secuencia codificadora (por ej., la SEC. ID N° 2 ó 4) para uno o más de los polipéptidos ALK1 objeto. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ALK1 descrito en la presente memoria puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ej., usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la materia.

De acuerdo con eso, la presente descripción se refiere además a métodos para producir los polipéptidos ALK1 objeto, incluyendo polipéptidos ECD ALK1. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ALK1 puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que tenga lugar la expresión del polipéptido ALK1. El polipéptido ALK1 puede ser segregado y aislado de una mezcla de células y medio que contenga el polipéptido ALK1. Alternativamente, el polipéptido ALK1 puede ser retenido citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células ser recogidas, lisadas y las proteínas aisladas. Un cultivo celular incluye células huésped, medio y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo de células son conocidos en la técnica. Los polipéptidos ALK1 objeto pueden aislarse del medio de cultivo celular, células huésped o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmovilización de anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ALK1 y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ALK1 (por ej., puede usarse una columna de proteínas A para purificar una fusión de ALK1-Fc). En una realización preferida, el polipéptido ALK1 es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferida, la purificación se consigue por una serie de etapas de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de lo siguiente, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en Q-sefariosa, cromatografía en fenilsefariosa, cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podía completarse con filtración vírica e intercambio de tampón.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el N-terminal de la porción deseada del polipéptido ALK1 recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación puede retirarse con posterioridad después por tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido ALK1 purificado (por ej., véase, Hochuli et al., (1.987) J. Chromatography 411: 177 y Janknecht et al., PNAS USA 88: 8.972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifiquen diferentes secuencias de polipéptidos se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando términos acabados en extremos romos o extremos escalonados para ligadura, digestión de enzima de restricción

para proporcionar términos apropiados, relleno de extremos cohesivos cuando sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseable y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la multiplicación PCR de fragmentos génicos puede realizarse usando cebadores de anclaje que den lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden hibridarse con posterioridad para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1.992).

Los ejemplos de categorías de compuestos de ácidos nucleicos que son antagonistas de ALK1, BMP9, BMP10, GDF5, GDF6 o GDF7 incluyen ácidos nucleicos de hebra complementaria, construcciones de ARNi y construcciones de ácidos nucleicos catalíticas. Un compuesto de ácido nucleico puede ser mono o bicatenario. Un compuesto bicatenario puede incluir también regiones de saliente o no complementariedad, en el caso de que una o la otra de las hebras sea monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, que significa que el compuesto forma una estructura denominada "horquilla" o "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 consista en no más de 1.000, 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 ALK1 de longitud completa o secuencia de ácidos nucleicos de ligandos. La región de complementariedad tendrá preferiblemente al menos 8 nucleótidos y opcionalmente al menos 10 o al menos 15 nucleótidos y opcionalmente entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede encontrarse dentro de un intrón, una secuencia codificadora o una secuencia no codificadora de la transcripción objetivo, tal como la porción de secuencia codificadora. En general, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases en longitud y opcionalmente la longitud será aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (en particular para uso como una hebra complementaria), ARN o híbrido ARN:ADN. Cualquier hebra puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Asimismo, un compuesto bicatenario puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN y cualquier hebra puede incluir también una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, incluyendo una o modificaciones en la cadena principal (la porción azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo uniones internucleótido) o la porción de la base (la porción de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico de hebra complementaria tendrá preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y contendrá con frecuencia una o más modificaciones para mejorar las características tales como estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar donde el compuesto es probable que se suministre, tal como el estómago en el caso de compuestos suministrados por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de una construcción de ARNi, la hebra complementaria para la transcripción objetivo será en general ARN o modificaciones del mismo. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La doble porción de construcción de ARNi "horquilla" bicatenaria o monocatenaria presentará preferiblemente una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, mientras sirva como un sustrato Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y también pueden contener formas modificadas. Los compuestos de ácidos nucleicos pueden inhibir la expresión del objetivo por aproximadamente 50%, 75%, 90% o más cuando se ponen en contacto con células en condiciones fisiológicas y en una concentración en la que un control de no transcripción o transcripción presenta poco efecto o ninguno. Las concentraciones preferidas para ensayar el efecto de los compuestos de ácidos nucleicos son 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácidos nucleicos pueden ensayarse también para efectos sobre, por ejemplo, la angiogénesis.

4. Modificaciones en proteínas de fusión fc.

La solicitud proporciona además proteínas de fusión ALK1-Fc con regiones Fc logradas o variantes. Dichas proteínas de fusión Fc pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de funciones efectoras, tales como, citotoxicidad dependiente de antígeno (ADCC, por sus siglas en inglés) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Adicionalmente, las modificaciones pueden mejorar la estabilidad de las proteínas de fusión Fc. Las variantes de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión Fc se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN o por síntesis de péptidos. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión Fc descritas en la presente memoria. Cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden modificar procedimientos postraduccion de las proteínas de fusión Fc, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación.

Las proteínas de fusión Fc con función efectora reducida pueden producirse introduciendo cambios en la secuencia de aminoácidos, incluyendo, pero no limitándose a, la mutación Ala-Ala descrita por Bluestone et al. (véase, la Patente Internacional WO 94/28027 y la Patente Internacional WO 98/47531; también véase Xu et al. 2.000 Cell Immunol 200; 16-26). Así en algunas realizaciones, las proteínas de fusión Fc de la descripción con mutaciones dentro de la región constante incluyendo la mutación Ala-Ala pueden usarse para reducir o eliminar la función efectora. De acuerdo con estas realizaciones, las proteínas de fusión Fc pueden comprender una mutación a una

alanina en la posición 234 o una mutación a una alanina en la posición 235 o una combinación de los mismos. En una realización, la proteína de fusión Fc comprende un entramado IgG4, en el que la mutación Ala-Ala describiría una mutación o mutaciones de fenilalanina a alanina en la posición 234 y/o una mutación de leucina a alanina en la posición 235. En otra realización, la proteína de fusión Fc comprende un entramado IgG1, en el que la mutación Ala-Ala describiría una mutación o mutaciones de leucina a alanina en la posición 234 y/o una mutación de leucina a alanina en la posición 235. La proteína de fusión Fc puede portar alternativamente o adicionalmente otras mutaciones, incluyendo la mutación puntual K322A en el dominio CH2 (Hezareh et al. 2.001 J Virol. 75: 12.161-8).

En realizaciones particulares, la proteína de fusión Fc puede modificarse para activar o inhibir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Se puede conseguir actividad CDC modulada por introducción de una o más sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos en una región Fc (véase, por ej., la patente de EE.UU. N° 6.194.551). Alternativamente o adicionalmente, puede introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlace disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede presentar capacidad de internalización mejorada o reducida y/o destrucción celular mediada por complemento aumentada o disminuida. Véase, Caron et al., J. Exp Med. 176:1.191-1.195 (1.992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2.918-2.922 (1.992), patente internacional WO 99/51642, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1.988); Patente de EE.UU. N° 5.648.260; Patente de EE.UU. N° 5.624.821 y patente internacional WO 94/29351.

5. Métodos y composiciones para modular la angiogénesis y ciertos trastornos.

Las enfermedades asociadas a la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide; soriasis; rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis en el miocardio; neovascularización de las placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas y angiofibroma.

En algunas realizaciones de dichos métodos, se puede administrar uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos, juntos (simultáneamente) o en momentos diferentes (secuencialmente). Además, se pueden administrar agentes terapéuticos polipeptídicos con otro tipo de compuestos para inhibir la angiogénesis.

Un amplio grupo de compuestos convencionales ha demostrado tener actividades antineoplásicas. Estos compuestos se han usado como agentes farmacéuticos en quimioterapia para reducir tumores sólidos, prevenir las metástasis y crecimiento adicional o disminuir el número de células malignas en tumores malignos leucémicos o de médula ósea. Aunque la quimioterapia ha sido eficaz en el tratamiento de varios tipos de tumores malignos, muchos compuestos antineoplásicos inducen efectos secundarios indeseables. Se ha demostrado que cuando dos o más tratamientos diferentes se combinan, los tratamientos pueden actuar de manera sinérgica y permitir la reducción de la dosis de cada uno de los tratamientos, reduciendo de ese modo los efectos secundarios perjudiciales ejercidos por cada compuesto a dosis mayores. En otros casos, los tumores malignos que son resistentes a un tratamiento pueden responder a un tratamiento asociado de dos o más tratamientos diferentes.

Cuando un agente terapéutico polipeptídico descrito en la presente memoria es administrado en asociación con otro agente antineoplásico convencional, de manera concomitante o de manera secuencial, dicho agente terapéutico puede mejorar el efecto terapéutico del agente antineoplásico o superar la resistencia celular a dicho agente antineoplásico. Esto permite la disminución de la dosis de un agente antineoplásico, reduciendo de ese modo los efectos secundarios no deseables o restaura la eficacia de un agente antineoplásico en células resistentes.

Según la presente descripción, los agentes antiangiogénicos descritos en la presente memoria pueden usarse en asociación con otras composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, se puede tratar un tumor de manera convencional con cirugía, radiación o quimioterapia asociada al antagonista del ALK1 o ligando ALK1 y después puede administrarse con posterioridad el antagonista al paciente para extender la inactividad de las metástasis y estabilizar cualquier tumor primario residual.

Como se demuestra en la presente memoria, ALK1-Fc es eficaz para disminuir el fenotipo de un modelo de murina de artritis reumatoide. De acuerdo con esto, los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria pueden usarse para el tratamiento de la artritis reumatoide y otro tipo de inflamación ósea o articular.

Ciertos procedimientos fisiológicos normales también están asociados a la angiogénesis, por ejemplo, ovulación, menstruación y placentación. Las proteínas que inhiben la angiogénesis de la presente descripción son útiles en el tratamiento de la enfermedad de estimulación excesiva o anormal de células endoteliales. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, adhesiones intestinales, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas, es decir, queloides. También son útiles en el tratamiento de enfermedades que presentan angiogénesis como una consecuencia patológica tal como enfermedad por arañazo de gato (Rochele minalia quintosa) y úlceras (*Helicobacter pylori*).

Pueden usarse proteínas que inhiban la angiogénesis general como un agente de control de la natalidad reduciendo o evitando la vascularización uterina requerida para la implantación de embriones. Así, la presente descripción proporciona un método de control de la natalidad cuando se administra a una mujer una cantidad de la proteína inhibitoria suficiente para evitar la implantación del embrión. En un aspecto del método de control de la natalidad, se administra una cantidad de la proteína inhibitoria suficiente para bloquear la implantación embrionaria antes o

después de la relación sexual y que tenga lugar la fertilización, proporcionándose así un método eficaz de control de la natalidad, posiblemente, un método "día siguiente". Aunque no se desea estar ligados por esta afirmación, se cree que la inhibición de la vascularización del endometrio uterino interfiere con la implantación del blastocito. La inhibición similar de la vascularización de la mucosa del tubo uterino interfiere con la implantación del blastocito, evitándose la ocurrencia de un embarazo tubárico. Los métodos de administración pueden incluir, pero no se limitan a, píldoras, inyecciones (intravenosa, subcutánea, intramuscular), supositorios, esponjas vaginales, tampones vaginales y dispositivos intrauterinos. También se cree que la administración de agentes que inhiben la angiogénesis de la presente descripción interferirán con la vascularización mejorada normal de la placenta y también con el desarrollo de vasos dentro de un blastocisto implantado con éxito y embrión y feto que se desarrolle.

En el ojo, la angiogénesis está asociada a, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo del injerto corneal, glaucoma neovascular y fibroplasias retrolentales. Los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria pueden administrarse por vía intraocular o por otra administración local al ojo. Además, como se muestra en los Ejemplos, se puede administrar ALK1-Fc de manera sistémica y aún presentar el efecto deseado sobre la angiogénesis ocular.

Otras enfermedades asociadas a la angiogénesis en el ojo incluyen, pero no se limitan a, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de Vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratoconjuntivitis seca del pterigión, sjogren, acné rosáceo, filectenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, sacoidosis de Wegener, escleritis, enfermedad de Steven's Johnson, queratomía radial perifigóide y rechazo de injerto corneal, anemia falciforme, sarcoide, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de la carótida, uveitis crónica/vitritis, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechets, infecciones que causan retinitis o coroiditis, histoplasmosis ocular presunta, enfermedad de Best, miopía, criptas ópticas, enfermedad de Stargart, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, complicaciones de traumatismos y postláser. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas a rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades ocasionadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa.

Las afecciones del ojo se pueden tratar o evitar por, por ejemplo, inyección sistémica, tópica, intraocular de un agente terapéutico o por inserción de un dispositivo de liberación prolongada que libera un agente terapéutico. Un agente terapéutico puede suministrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de manera que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en las regiones corneal e interna del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, lente, coroide/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulamiento. Alternativamente, los agentes terapéuticos de la descripción pueden inyectarse directamente en el humor vítreo y acuoso. En una alternativa adicional, los compuestos se pueden administrar por vía sistémica, tal como por infusión intravenosa o inyección, para tratamiento del ojo.

Se puede administrar uno o más agentes terapéuticos. Los métodos de la descripción también incluyen la administración conjunta con otros medicamentos que se usan para tratar afecciones del ojo. Cuando se administra más de un agente o una combinación de agentes y medicamentos, la administración puede tener lugar de manera simultánea o de manera secuencial en el tiempo. Los agentes terapéuticos y/o medicamentos pueden administrarse por diferentes vías de administración o por la misma vía de administración. En una realización, se administran juntos un agente terapéutico y un medicamento en una formulación farmacéutica oftálmica.

En una realización, se usa un agente terapéutico para tratar una enfermedad asociada a la angiogénesis en el ojo por administración concurrente con otros medicamentos que actúan bloqueando la angiogénesis por mecanismos farmacológicos. Los medicamentos que pueden administrarse de manera concurrente con un agente terapéutico de la descripción incluyen, pero no se limitan a, pegaptanib (Macugen™), ranibizumab (Lucentis™), lactato de escualamina (Evizon™), heparinasa y glucocorticoides (por ej., Triamcinolona). En una realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad asociada a la angiogénesis se trata por administración de una formulación farmacéutica oftálmica que contiene al menos un agente terapéutico descrito en la presente memoria y al menos uno de los siguientes medicamentos: pegaptanib (Macugen™), ranibizumab (Lucentis™), lactato de escualamina (Evizon™), heparinasa y glucocorticoides (por ej., Triamcinolona).

6. Formulaciones y dosis eficaces.

Los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente descripción pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Dichas formulaciones estarán en general sustancialmente exentas de pirógeno, conforme a la mayoría de los requerimientos reguladores.

En algunas realizaciones, el método terapéutico de la descripción incluye administrar la composición por vía sistémica o por vía local como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta descripción está en una forma fisiológicamente aceptable, exenta de pirógeno. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de señalización de ALK1 que también pueden estar incluidos opcionalmente en la composición como se describió anteriormente, pueden administrarse de manera simultánea o de manera secuencial con los compuestos objeto (por ej., polipéptidos ECD ALK1 descritos en la presente memoria) en los métodos descritos en la presente memoria.

Típicamente, los agentes terapéuticos proteínicos descritos en la presente memoria se administrarán por vía parenteral y en particular por vía intravenosa o por vía subcutánea. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ECD ALK1 en asociación con una o más disoluciones acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones, isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que puedan reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor destinado o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos, adecuados, que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

En una realización, las proteínas ECD ALK1 descritas en la presente memoria se administran en una formulación farmacéutica oftálmica. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica oftálmica es una disolución acuosa estéril, preferible de concentración adecuada para inyección o un bálsamo o pomada. Dichos bálsamos o pomadas comprenden típicamente una o más proteínas ECD ALK1 descritas en la presente memoria disueltas o suspendidas en una base de bálsamo o pomada farmacéuticamente aceptable, estéril, tal como una base de aceite de parafina-vaselina blanca. En composiciones de bálsamo o pomada, también puede estar incluida lanolina anhidra en la formulación. También se añaden preferiblemente timerosal o clorobutanol a dichas composiciones de pomada como agentes antimicrobianos. En una realización, la disolución acuosa estéril es como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.071.958.

La descripción proporciona formulaciones que pueden variarse para que se incluyan ácidos y bases para ajustar el pH y agentes tamponantes para mantener el pH dentro de un intervalo estrecho. Se pueden añadir medicamentos adicionales a la formulación. Estos incluyen, pero no se limitan a, pegaptanib, heparinasa, ranibizumab o glucocorticoides. La formulación farmacéutica oftálmica según la descripción se prepara por manipulación aséptica o esterilización en una fase de preparación adecuada.

Las composiciones y formulaciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias conteniendo el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, hoja fina de metal o de plástico, tal como un envase de ampollas. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para administración.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Expresión de proteínas de fusión ALK1-Fc.

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ALK1 soluble que presenta el dominio extracelular de ALK1 humana fusionada a una Fc humana o ALK1 de ratón fusionada a un dominio Fc de murina con un ligador mínimo en medio. Las construcciones se refieren como hALK1-Fc y mALK1-Fc, respectivamente.

Se muestra hALK1-Fc como purificado de estirpes celulares de CHO en la Figura 3 (SEC. ID Nº 3). Especialmente, mientras el C-terminal convencional del dominio extracelular de proteína ALK1 humana es el aminoácido 118 de la SEC. ID Nº 1, se determina que es deseable evitar tener un dominio que termine en un resto glutamina. De acuerdo con esto, la porción de la SEC. ID Nº 3 que procede de ALK1 humana incorpora dos restos c-terminales a Q118, una leucina y una alanina. La descripción, por lo tanto, proporciona polipéptidos ECD ALK1 (incluyendo proteínas de fusión Fc) que tienen un C-terminal de la secuencia procedente del ALK1 que es cualquier parte de 1 a 5 los aminoácidos aguas arriba (113-117 relativo a la SEC. ID Nº 1) o aguas abajo (119-123) de Q118.

Las proteínas hALK1-Fc y mALK1-Fc se expresaron en estirpes celulares de CHO. Se consideraron tres diferentes secuencias líder:

(i) Melitina de abeja (HBML): MKFLVNLVFMVVYISYIYA (SEC. ID Nº 7)

(ii) Activador de plasminógeno de tejidos (TPA, por sus siglas inglés): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEC. ID Nº 8)

(iii) Natural: MTLGSPRKGLMLLMALVTQG (SEC. ID Nº 9).

La forma seleccionada emplea el líder TPA y presenta la secuencia de aminoácidos no procesada mostrada en la Figura 4 (SEC. ID N° 5).

Este polipéptido es codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la Figura 4 (SEC. ID N° 4).

Se puede conseguir purificación por una serie de etapas de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de lo siguiente, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en Q-seferosa, cromatografía en fenilseferosa, cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podía completarse con filtración vírica e intercambio de tampón. La proteína hALK1-Fc se purificó a una pureza de >98% cuando se determina por cromatografía de exclusión de tamaños y >95% cuando se determina por SDS PAGE.

Ejemplo 2: Identificación de ligandos ALK1-Fc.

ALK1 es un receptor tipo I para miembros de la familia TGF β . Se ensayó en una variedad de miembros de la familia TGF β la unión a una proteína de fusión ALK1-Fc humana, usando un sistema Biacore™. El propio TGF β , GDF8, GDF11, BMP2 y BMP4 fracasaron todos en mostrar la unión sustancial a la proteína hALK1-Fc. BMP2 y BMP4 mostraron unión limitada. GDF5, GDF7 y BMP9 mostraron unión con valores de K_D de aproximadamente 5×10^{-8} M, 5×10^{-8} M y 1×10^{-10} M, respectivamente. Basándose en la similitud de GDF5 y GDF7 a GDF6, se espera que GDF6 se una con similar afinidad. BMP10 está estrechamente relacionado con BMP9 y también se espera que se una con afinidad similar.

Ejemplo 3: Caracterización de ALK1-Fc y efectos de anticuerpo anti-ALK1 sobre células endoteliales.

Usando una construcción informadora de luciferasa bajo el control de cuatro sitios SBE de consenso secuencial (SBE4-luc), que son sensibles a señalización mediada por Smad1/5/8, se midió la actividad mediada por BMP-9 en presencia y en ausencia de fármaco de hALK1-Fc o neutralización de anticuerpo monoclonal específico de ALK1 en células HMVEC. Se estimularon células HMVEC con rhBMP-9 (50 ng/ml), que indujo activación de la transcripción mediada por Smad1/5/8 puesta de manifiesto en la presente por el aumento en la regulación hacia arriba de la transcripción modulada por SBE4-luc. Cuando se añade, el compuesto de hALK1-Fc (10 μ g/ml) o anticuerpo (10 μ g/ml) disminuyó su respuesta transcripcional, cada uno por casi 60%, indicando que la presencia de ALK1-Fc reduce significativamente la señalización de BMP9 y, por otra parte, que la señalización de BMP9 está relacionada con la actividad de ALK1.

La activación de fosforilación de SMAD se usa comúnmente para ensayar la activación de los receptores de activina aguas arriba. Se sabe que ALK1 modula la fosforilación de proteínas SMAD 1,5 y 8 en la activación por este ligando. Aquí, se añaden rhBMP-9 (50 ng/ml) para iniciar la fosforilación de SMAD en células HUVEC, una estirpe de células endoteliales humanas que expresa intrínsecamente el receptor de ALK1 durante un transcurso del tiempo de 30 minutos. La fosforilación de SMAD 1/5/8 se observó 5 minutos después de tratamiento de las células con ligando y se mantuvo la fosforilación durante la totalidad del periodo de 30 minutos. En presencia de concentraciones relativamente bajas de hALK1-Fc (250 ng/ml), se redujo la fosforilación de SMAD 1/5/8, que confirma que este agente inhibe la activación de Smad1/5/8 en células endoteliales.

Para evaluar el efecto angiogénico de ALK1-Fc en un sistema in vitro, se ensayó la eficacia del compuesto en la reducción de la formación de tubo de células endoteliales en un sustrato Matrigel. Esta técnica se usa comúnmente para valorar la neovascularización, proporcionando resultados tanto rápidos como altamente reproducibles. Se usa suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS, por sus siglas en inglés) para inducir la formación de microvasos a partir de células endoteliales en Matrigel y la eficacia de compuestos antiangiogénicos se estima después como una reducción de la formación de cordón en presencia de tanto el fármaco como ECGS durante un transcurso de tiempo de 18 horas. Como se espera, la adición de ECGS (200 ng/ml) indujo la formación significativa de cordón, cuando se compara con el control negativo (no tratamiento añadido), que indica niveles basales de formación de cordón de células endoteliales producidas en sustrato Matrigel (Fig. 5). En la adición de hALK1-Fc (100 ng/ml) o mALK1-Fc (100 ng/ml), la formación de cordón se redujo visiblemente. La cuantificación final de la longitud del vaso en todas las muestras reveló que cada concentración de hALK1-fc o mALK1-Fc redujo la neovascularización a niveles basales. Adicionalmente, hALK1-Fc y mALK1-Fc en presencia del factor fuertemente pro-angiogénico ECGS mantuvo fuerte inhibición de neovascularización que demuestra actividad antiangiogénica incluso más potente que el control negativo endostatina (100 ng/ml).

Ejemplo 4: Ensayos CAM.

Se sabe que VEGF y FGF estimulan la angiogénesis. Se usó un sistema de ensayo CAM (membrana corioalantoidea de pollo) para valorar los efectos angiogénicos de GDF7. Como se muestra en la Figura 6, GDF7 estimula la angiogénesis con una potencia que es similar a la de VEGF. Se observaron resultados similares con GDF5 y GDF6.

Se ensayaron fusiones ALK1-Fc para actividad antiangiogénica en el ensayo CAM. Estas proteínas de fusión mostraron un potente efecto antiangiogénico sobre la angiogénesis estimulada por VEGF, FGF y GDF7. Véase la Figura 7. BMP9 y PDGF mostraron una capacidad relativamente deficiente para inducir la angiogénesis en este

ensayo, pero dicho efecto angiogénico de estos factores fue inhibido, sin embargo, por ALK1.

Las proteínas ALK1-Fc y un anticuerpo monoclonal anti-VEGF antiangiogénico, comercialmente disponible, se compararon en el ensayo CAM. Las proteínas ALK1-Fc presentaron una potencia similar cuando se compara con anti-VEGF. El anticuerpo anti-VEGF bevacizumab se usan normalmente en el tratamiento de cáncer y degeneración macular en seres humanos. Véase la Figura 8.

Curiosamente, un anticuerpo anti-ALK1 (R&D Systems) fracasó en inhibir significativamente la angiogénesis en este sistema de ensayo. Se espera que ésto pueda reflejar la diferencia en la secuencia de ALK1 en diferentes especies.

Ejemplo 5: Ensayo de microbolsa corneal de ratón.

El ensayo de microbolsa corneal de ratón se usó para valorar los efectos de ALK1-Fc sobre la angiogénesis en el ojo de ratón. hALK1-Fc, administrado por vía intraperitoneal, inhibió significativamente la angiogénesis ocular. Como se muestra en la Figura 9, hALK1-Fc inhibió la angiogénesis ocular al mismo grado que anti-VEGF. Se usaron hALK1-Fc y anti-VEGF a idénticas dosis peso/peso. Se obtuvieron datos similares cuando fue implantado un tapón Matrigel impregnado con VEGF en una posición no ocular.

Estos datos demuestran que los ligandos de alta afinidad para ALK1 activan la angiogénesis y que una proteína de fusión ALK1-Fc presenta una actividad antiangiogénica potente. Los ligandos para ALK1 se encuentran en dos categorías, teniendo el agrupamiento GDF5,6,7 una afinidad intermedia para ALK1 y teniendo el agrupamiento BMP9,10 una alta afinidad para ALK1.

Se localizan principalmente GDF5, 6 y 7 para hueso y articulaciones, mientras que BMP9 se hace circular en la sangre. Así, parece haber un sistema proangiogénico de los huesos y articulaciones que incluye ALK1, GDF5, 6 y 7 y un sistema angiogénico sistémico que incluye ALK1 y BMP9 (y posiblemente BMP10).

Ejemplo 6: Modelo de murina de artritis reumatoide.

El modelo de artritis inducida por colágeno de murina es un modelo aceptado de artritis reumatoide. En este estudio, se trataron grupos de 10 ratones con vehículo, anti-VEGF (bevacizumab - como un control negativo, debido a que bevacizumab no inhibe VEGF de murina) o dosis de mALK1-Fc ("RAP-041") a 1 mg/kg, 10 mg/kg o 25 mg/kg. Después del refuerzo de colágeno el día 21 las valoraciones artríticas (véase la Figura 10) y la hinchazón de la pata aumentó constantemente en todos los grupos, dando un máximo alrededor del día 38. Los ratones tratados con mALK1-Fc ("RAP-041") mostraron valoraciones reducidas para ambas características, en particular a la dosis más alta (25 mg/kg), aunque la reducción no consiguió una significación estadística. Sin embargo, es evidente la tendencia relacionada con la dosis.

Para la terminación del estudio el día 42 la incidencia de artritis había alcanzado 10/10 en los ratones tratados con control de vehículo, 9/10 en los ratones tratados con bevacizumab, 8/10 en el grupo tratado con mALK1-Fc a 1 mg/kg y 9/10 en el grupo tratado con 10 mg/kg de mALK1-Fc. En el grupo tratado con 25 mg/kg de mALK1-Fc la incidencia de enfermedad fue menor que 6/10.

Ejemplo ilustrativo 7: Modelo de murina de mieloma múltiple.

El mieloma múltiple es un cáncer principalmente del hueso que se asocia a pérdida sustancial de hueso. El modelo 5T2MM de mieloma en ratones se basa en el uso de células tumorales (células 5T2MM) de un tipo de tumor espontáneo que se desarrolla en ratones ancianos y causa efectos en los ratones que son similares a los observados en pacientes de mieloma múltiple humanos. Véase, por ej., Vanderkerken et al., Methods Mol Med. 2.005; 113:191-205. Se ensayaron en mALK1-Fc efectos en este modelo.

Las células 5T2MM inyectadas en ratones C57BL/KaLwRij potencian un aumento en superficie osteoclástica, la formación de lesiones osteolíticas y produjeron una disminución en área ósea. La enfermedad ósea se asocia a una disminución en el número de osteoblastos, superficie de osteoblastos y una reducción en la mineralización.

Se trataron ratones que soportaban células 5T2MM con mALK1-Fc (RAP-041) (10 mg/kg, i. p. dos veces a la semana) o un vehículo, desde el momento de la inyección de 5T2MM, durante un total de 12 semanas. El análisis MicroCT de la tibia proximal y las vértebras lumbares demostró una reducción estadísticamente significativa en el volumen de hueso esponjoso y número trabecular en ratones que soportaban 5T2MM comparado con ratones vírgenes (volumen óseo reducido por 40% respecto a los controles; número trabecular reducido por 40%). RAP-041 evitó completamente disminuciones inducidas por 5T2MM en volumen óseo y número trabecular cuando se compara con ratones tratados con vehículo (los ratones tratados tenían un volumen óseo de 120% respecto a los controles no tumorados y número trabecular de 115% respecto a controles no tumorados). Adicionalmente, los ratones tratados con tumor desarrollaron lesiones óseas líticas que fueron detectadas por microCT. El tratamiento de mALK1-Fc redujo el número de lesiones óseas líticas por 50% respecto a ratones tratados con vehículo.

Basándose en los efectos antiangiogénicos de ALK1-Fc, se deduce que el efecto protector para el hueso proporcionado por este agente es una consecuencia de crecimiento disminuido del tumor.

Por lo tanto, ALK1-Fc puede usarse para tratar mieloma múltiple y para disminuir los efectos de enfermedad ósea que resulte de este tipo de tumor.

5 Tomados juntos, los hallazgos descritos en estos Ejemplos proporcionan numerosos reactivos, descritos en la presente memoria, para inhibir la angiogénesis in vivo, y en particular angiogénesis ocular. Estos hallazgos también indican que los agentes fijados como objetivo para GDF5, 6 y 7 pueden usarse para inhibir de manera selectiva la angiogénesis ósea y articular. Estos hallazgos indican además que dichos agentes pueden usarse para tratar la artritis reumatoide.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión ALK1-Fc que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es al menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos 22-118 de la SEC ID N° 1, en la que la proteína de fusión ALK1-Fc inhibe la angiogénesis estimulada por VEGF, FGF y GDF7, para uso en: (a) inhibición de angiogénesis en un mamífero o (b) tratamiento de artritis reumatoide en un mamífero.
2. La proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión ALK1-Fc inhibe la angiogénesis estimulada por VEGF, FGF y GDF7 en un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM).
3. La proteína de fusión ALK1-Fc para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteína de fusión ALK1-Fc se une a GDF5, GDF7 y BMP9 con una K_D menor que 1×10^{-7} M y se une a TGF β -1 con una K_D mayor que 1×10^{-6} M.
4. La proteína de fusión ALK1-Fc para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la porción Fc es una porción Fc de una IgG1 humana.
5. La proteína de fusión ALK1-Fc para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.
6. Una preparación farmacéutica, que está opcionalmente sustancialmente exenta de pirógeno, que comprende una proteína de fusión ALK1-Fc para uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. La preparación para uso según la reivindicación 6, que es una formulación farmacéutica oftálmica.

Figura 1: Secuencia de aminoácidos para cinasa 1 tipo receptor de activina humana (ALK-1)

(gi:3915750; SEC ID N° 1)

1 MTLGSPRKGL LMLLMALVTQ GDPVKPSRGP LVTCTCESPH CKGPTCRGAW CTVVLVREEG
61 RHPQEHRCG NLHRELCRGR PTEFVNHYCC DSHLCNHNVS LVLEATOPPS EOPGTDGQLA
121 LILGPVLALL ALVALGVLGL WHVRRRQEQ RGLHSELGES SLILKASEQG DSMLGDLLDS
181 DCTTGSGSGL PFLVORTVAR OVALVECVGK GRYGEVWRGL WHGESVAVKIFSSRDEQSWF
241 RETEIYNTVL LRHDNILGFL ASDMTSRNSS TQLWLITHYH EHGSLYDFLQ ROTLEPHLAL
301 RLAVSAACGL AHLHVEIEGT QGKPAIAHRD FKSRNVLVKS NLOCCIADLG LAVMHSQGS
361 YLDIGNNPRV GTKRYMAPEV LDEQIRTDCE ESYKWTDIWA FGLVLWEIAR RTIVNGIVED
421 YRPPFYDVVP NDPSFEDMKK VVCVDQOTPT IPNRLAADPV LSGLAQMMRE CWYPNPSARL
481 TALRIKKTLQ KISNSPEKPK VIQ

FIGURA 1

Figura 2: Secuencia de ácidos nucleicos para cinasa 1 tipo receptor de activina humana (ALK-1) (SEC ID N° 2)

```

1  atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgaccag
61  ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct gcacgtgtga gagccacat
121 tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg
181 aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgacac gggagctctg cagggggcgc
241 cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc
301 ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg ccagctggcc
361 ctgatactgg gccccgtgct ggccttgctg gccctggtgg ccctgggtgt cctgggctctg
421 tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cgtggcctgc acagcgagct gggagagtcc
481 agtctcatcc tgaaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt
541 gactgcacca cagggagtgg ctcagggctc cccttcctgg tgcaaggagc agtggcacgg
601 cagggttgct tgggtggagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg
661 tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtccctggttc
721 cgggagactg agatctataa cacagtgttg ctcagacacg acaacatcct aggccttcac
781 gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcactaccac
841 gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg
901 aggctagctg tgtccgcggc atggggcctg gcgcacctgc acgtggagat cttcgggtaca
961 cagggcaaac cagccattgc ccaccgcgac ttcaagagcc gcaatgtgct ggtcaagagc
1021 aacctgcagt gttgcatcgc cgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat
1081 tacctggaca tcggcaacaa cccgagagtg ggcaccaagc ggtacatggc acccgaggtg
1141 ctggacgagc agatccgcac ggactgcttt gactcctaca agtggactga catctgggcc
1201 tttggcctgg tgctgtggga gattgcccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac
1261 tatagaccac cttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag
1321 gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agacccggtc
1381 ctctcaggcc tagctcagat gatgggggag tgctgggtacc caaaccctc tgcccgactc
1441 accgcgctgc ggatcaagaa gacactacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa
1501 gtgattcaat tg

```

FIGURA 2

Figura 3: Una proteína de fusión ALK-1-Fc (SEC ID N° 3).

DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLH
RELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPPSEQPGTDGQLATGGGT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 3

Figura 4: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica una construcción de expresión ALK1-Fc
(Secuencia de ácidos nucleicos, SEC ID N° 4; (Secuencia de ácidos nucleicos, SEC ID N° 5)

```

NheI      | - - - - - CDS - - - - -
|         M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V *
*         * * 20 * * * 40 * * * 60 * *
GCTAGCACCATGGATGCAATGAAGAGGGGCTCTGCTGTGTGCTGTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTT
KasI
|
- - - - - CDS - - - - -
S P G A D P V K P S R G P L V T C T C E S P H C
* 80 * * 100 * * 120 * * 140
CGCCCGGCGCCGACCTGTGAAGCGTCTCGGGGCGCGTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCACATTG
- - - - - CDS - - - - -
K G P T C R G A W C T V V L V R E E G R H P Q
* 160 * * 180 * * 200 * *
CAAGGGCCTACCTGCCGGGGGCGCTGGTGACAGTAGTGTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCGAG
- - - - - CDS - - - - -
E H R G C G N L H R E L C R G R P T E F V N H
* 220 * * 240 * * 260 * * 280
GAACATCGGGGCTGCGGGAACCTGCACAGGAGCTCTGCAGGGGCGCCCGACCGAGTTCGTCAACCACT
- - - - - CDS - - - - -
Y C C D S H L C N H N V S L V L E A T Q P P S E
* 300 * * 320 * * 340 * *
ACTGCTGCAGCAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGA
AgeI
|
- - - - - CDS - - - - -
Q P G T D G Q L A T G G G T H T C P P C P A P
* 360 * * 380 * * 400 * * 420
GCAGCCGGGAACAGATGGCCAGCTGGCCACCGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCT
- - - - - CDS - - - - -
E A L G A P S V F L F P P K P K D T L M I S R
* 440 * * 460 * * 480 * *
GAAGCCCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCGCTCATGATCTCCCGGA
- - - - - CDS - - - - -
T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
* 500 * * 520 * * 540 * * 560
CCCCGTGAGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGT
- - - - - CDS - - - - -
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
* 580 * * 600 * * 620 * *
GGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTG
- - - - - CDS - - - - -
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
* 640 * * 660 * * 680 * * 700
GTCAGCGTCTCACCGCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA
- - - - - CDS - - - - -
K A L P V P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
* 720 * * 740 * * 760 * *
AAGCCCTCCAGTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
- - - - - CDS - - - - -
T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F
* 780 * * 800 * * 820 * * 840
CACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
- - - - - CDS - - - - -
Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
* 860 * * 880 * * 900 * *
TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGAGAGCAACTACAAGACCAGCCTC
- - - - - CDS - - - - -
P V L D S D G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
* 920 * * 940 * * 960 * * 980
CCGTGTGTGAGTCCGACGGCCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
- - - - - CDS - - - - -
G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
* 1000 * * 1020 * * 1040 * *
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCC
EcoRI
|
- - - CDS - - -
L S P G K *
* 1060 * *
CTGTCTCCGGTAAATGAGGAATTC

```

FIGURA 4

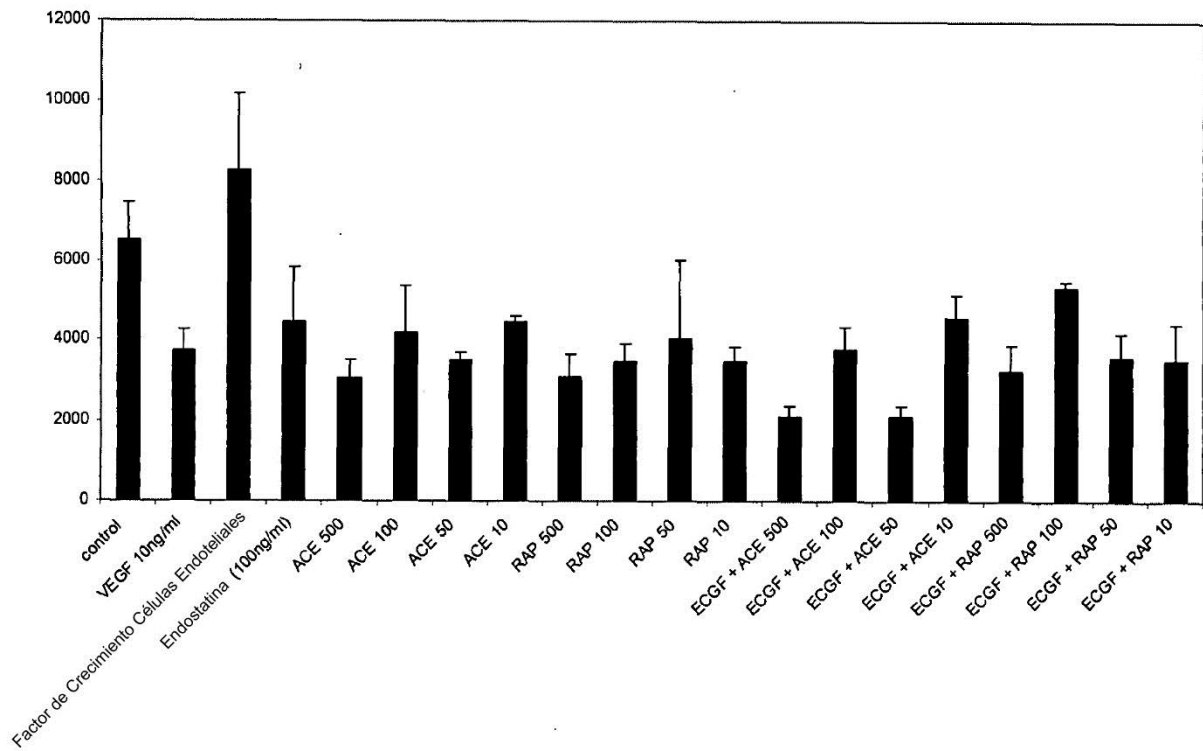


Figura 5

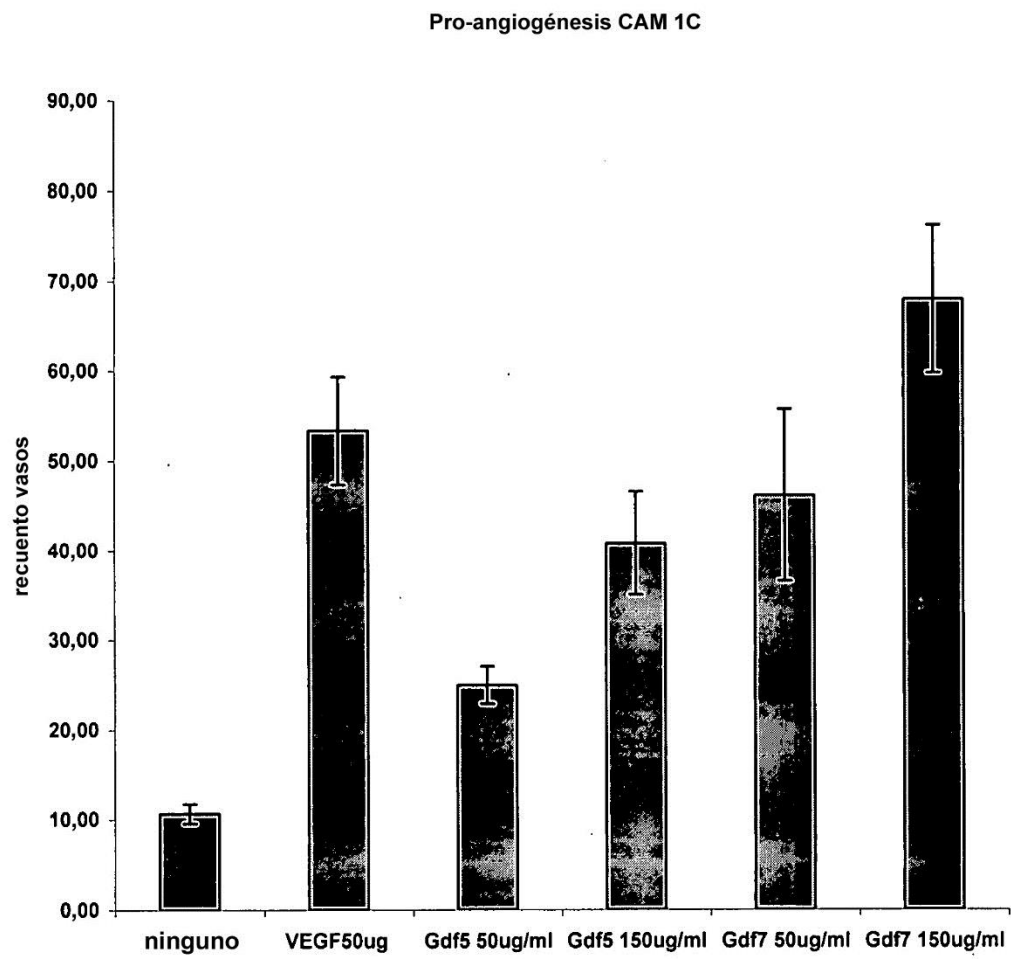


FIGURA 6

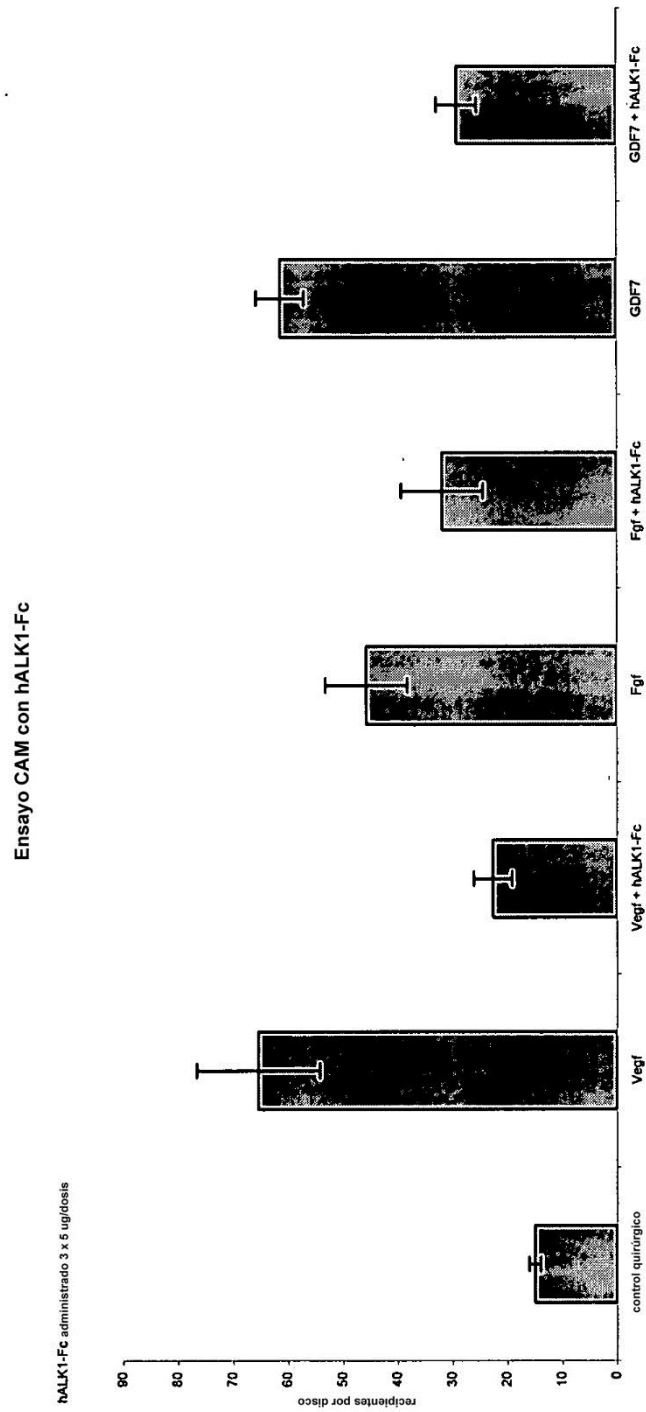


FIGURA 7

Ensayo de angiogenesis CAM

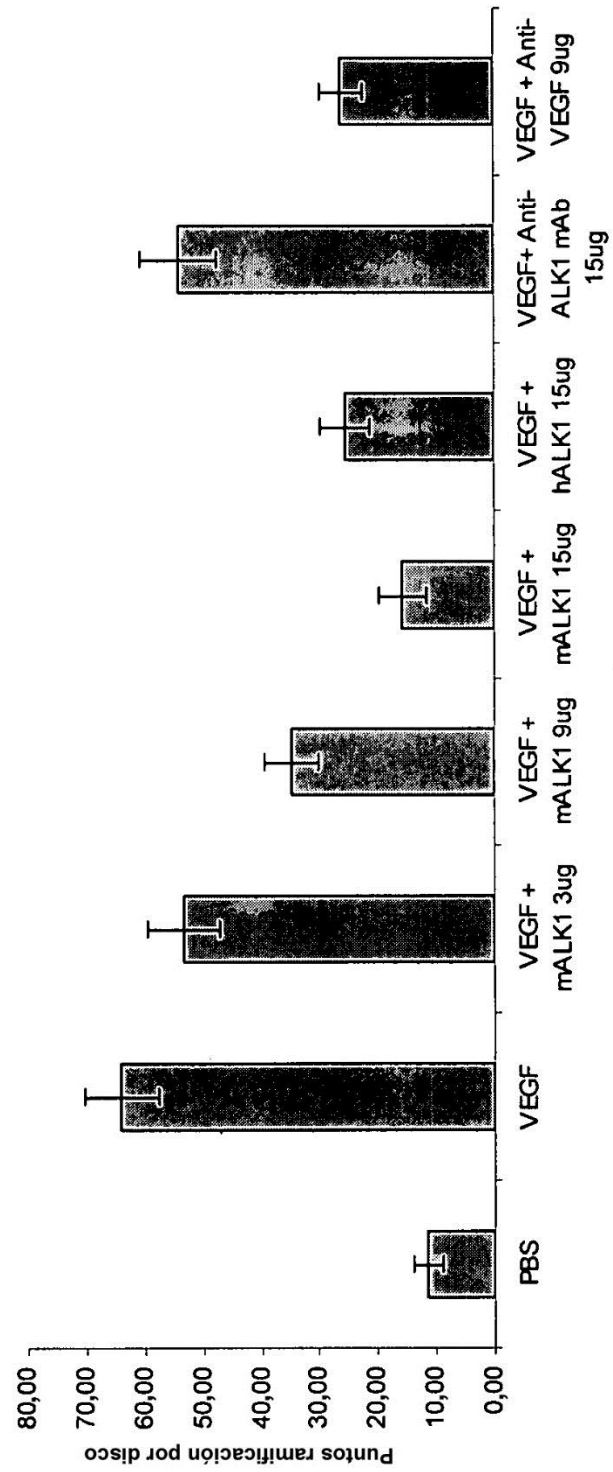


FIGURA 8

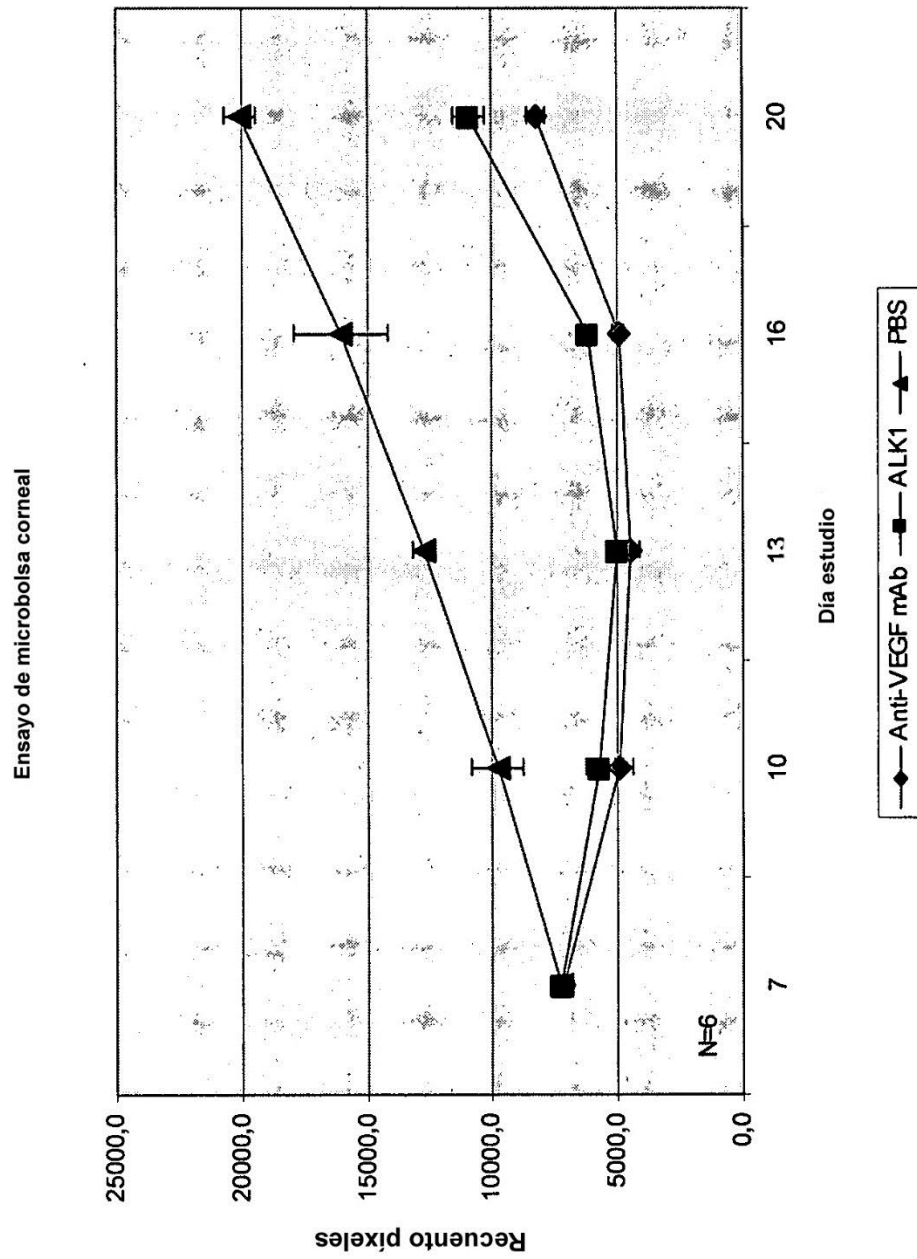


FIGURA 9

MDAC-1 - puntuaciones clínicas de artritis media

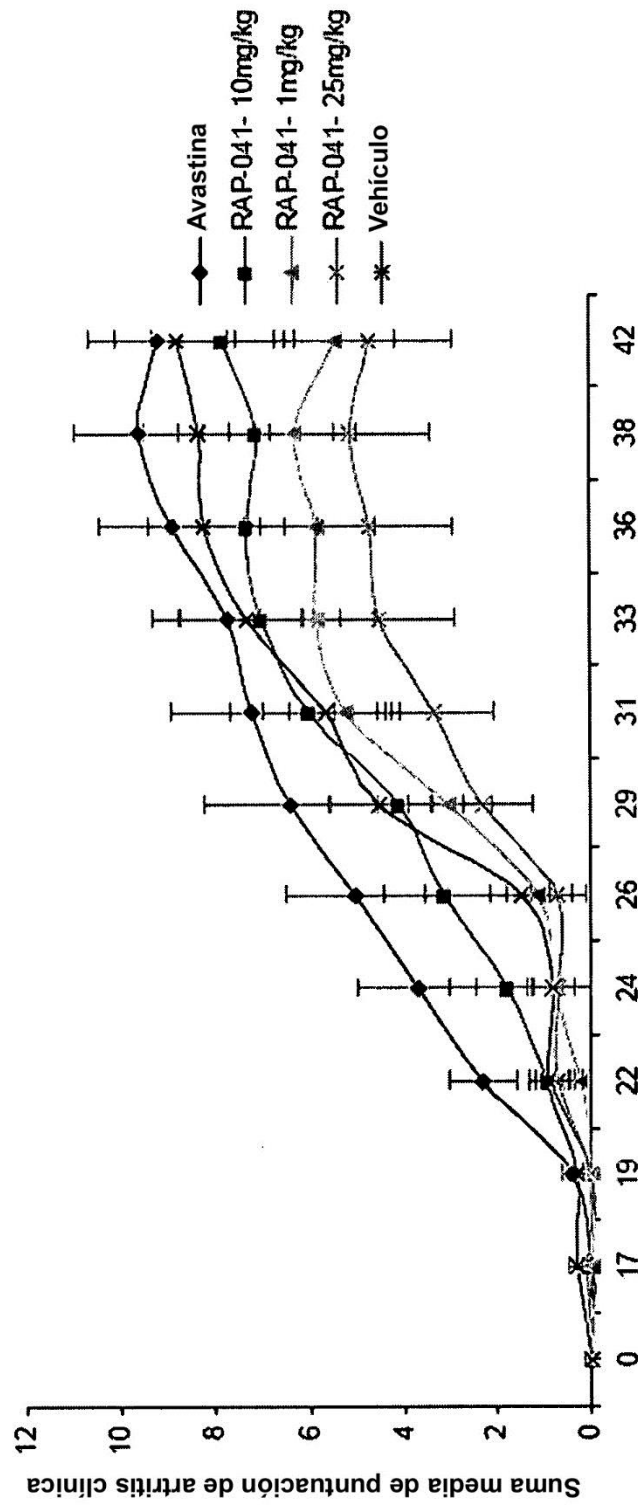


FIGURA 10