

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 725**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008** E 11195151 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** EP 2481415

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de Activina-ActRIIA**

30 Prioridad:

09.02.2007 US 90058007 P

31.05.2007 US 93276207 P

26.06.2007 US 93736507 P

25.10.2007 US 52807 P

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

27.04.2020

73 Titular/es:

ACCELERON PHARMA INC. (100.0%)

128 Sidney Street

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

KNOFF, JOHN;

SEEHRA, JASBIR y

KUMAR, RAVINDRA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 756 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de Activina-ActRIIA

5 Antecedentes de la invención

Los trastornos del hueso, que van desde la osteoporosis hasta las fracturas, representan un conjunto de estados patológicos para los que existen pocos agentes farmacéuticos efectivos. En cambio, el tratamiento se centra en intervenciones físicas y conductuales, que incluyen inmovilización, ejercicio y cambios en la dieta. Sería beneficioso tener agentes terapéuticos que promuevan el crecimiento óseo y aumenten la densidad ósea con el fin de tratar una variedad de trastornos óseos.

15 El crecimiento óseo y la mineralización dependen de las actividades de dos tipos de células, osteoclastos y osteoblastos, aunque los condrocitos y las células de la vasculatura también participan en aspectos críticos de estos procesos. En el desarrollo, la formación ósea ocurre a través de dos mecanismos, la osificación endocondral y la osificación intramembranosa, siendo el primero responsable de la formación ósea longitudinal y el segundo responsable de la formación de huesos topológicamente planos, como los huesos del cráneo. La osificación endocondral requiere la formación y degradación secuenciales de estructuras cartilaginosas en las placas de crecimiento que sirven como plantillas para la formación de osteoblastos, osteoclastos, la vasculatura y posterior mineralización. Durante la osificación intramembranosa, el hueso se forma directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y el posterior depósito de la matriz.

25 Las fracturas y otras alteraciones estructurales del hueso se curan mediante un proceso que, al menos superficialmente, se asemeja a la secuencia de eventos de desarrollo de osteogénesis, incluida la formación de tejido cartilaginoso y la posterior mineralización. El proceso de curación de fracturas puede ocurrir de dos maneras. La cicatrización ósea directa o primaria ocurre sin formación de callos. La cicatrización ósea indirecta o secundaria ocurre con una etapa precursora del callo. La curación primaria de fracturas implica la reforma de la continuidad mecánica a través de una interrupción estrechamente establecida. En condiciones adecuadas, las células de resorción ósea que rodean la disrupción muestran una respuesta de reabsorción de túnel y establecen vías para la penetración de los vasos sanguíneos y la posterior curación. La curación secundaria de los huesos sigue un proceso de inflamación, formación suave de callos, mineralización de callos y remodelación de callos. En la etapa de inflamación, la formación de hematomas y hemorragias resulta de la interrupción de los vasos sanguíneos periósticos y endostáticos en el sitio de la lesión. Las células inflamatorias invaden el área. En la etapa de formación de callo blando, las células producen nuevos vasos, fibroblastos, material intracelular y células de soporte, formando tejido de granulación en el espacio entre los fragmentos de fractura. La unión clínica a través de la interrupción se establece por tejido fibroso o cartilaginoso (callo blando). Los osteoblastos se forman y median la mineralización del callo blando, que luego se reemplaza por hueso lamelar y se somete a los procesos normales de remodelación.

40 Además de las fracturas y otras alteraciones físicas de la estructura ósea, la pérdida de contenido mineral óseo y la masa ósea pueden ser causadas por una amplia variedad de afecciones y pueden provocar problemas médicos importantes. Los cambios en la masa ósea ocurren de manera relativamente predecible durante la vida de un individuo. Hasta aproximadamente los 30 años, los huesos de hombres y mujeres crecen hasta alcanzar la masa máxima a través del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondral y el crecimiento radial. Después de aproximadamente los 30 años (para el hueso trabecular, por ejemplo, huesos planos como las vértebras y la pelvis) y los 40 años (para el hueso cortical, por ejemplo, los huesos largos que se encuentran en las extremidades), se produce una pérdida ósea lenta tanto en hombres como en mujeres. En las mujeres, también se produce una fase final de pérdida ósea sustancial, probablemente debido a deficiencias de estrógenos posmenopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y un 25% del compartimento trabecular. El hecho de que la pérdida ósea progresiva provoque una afección patológica como la osteoporosis depende en gran medida de la masa ósea inicial del individuo y de si existen afecciones exacerbantes.

55 La pérdida ósea a veces se caracteriza por un desequilibrio en el proceso normal de remodelación ósea. El hueso sano está constantemente sujeto a remodelación. La remodelación comienza con la resorción del hueso por los osteoclastos. El hueso reabsorbido es reemplazado por tejido óseo nuevo, que se caracteriza por la formación de colágeno por osteoblastos y la posterior calcificación. En individuos sanos, las tasas de reabsorción y formación son equilibradas. La osteoporosis es una condición crónica y progresiva, marcada por un cambio hacia la reabsorción, lo que resulta en una disminución general de la masa ósea y la mineralización ósea. La osteoporosis en humanos está precedida por osteopenia clínica (densidad mineral ósea que es mayor que una desviación estándar pero menor que 2.5 desviaciones estándar por debajo del valor medio para el hueso adulto joven). En todo el mundo, aproximadamente 60 75 millones de personas están en riesgo de osteoporosis.

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

65

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

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

Resumen de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActR11a-Fc, en donde la proteína de fusión ActR11a-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 fusionada a Fc, y en donde el dímero tiene tres o más unidades estructurales de ácido siálico.

La proteína de fusión ActR11a-Fc puede unirse a activina, que puede ser activina A o activina B, y/o GDF11. La composición farmacéutica puede ser adecuada para administración subcutánea. La proteína de fusión ActR11a-Fc puede expresarse a partir de una célula CHO, opcionalmente usando una secuencia guía del activador de plasminógeno tisular (TPA) que puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En parte, la divulgación demuestra que las moléculas que tienen actividad de activina o antagonista de ActR11a ("antagonistas de activina" y "antagonistas de ActR11a", colectivamente "antagonistas de activina-ActR11a") pueden usarse para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento óseo y/o aumentar la resistencia ósea. En particular, la divulgación demuestra que una forma soluble de ActR11a actúa como un inhibidor de la señalización de activina-ActR11a y promueve una mayor densidad ósea, crecimiento óseo y resistencia ósea in vivo. Si bien la mayoría de los agentes farmacéuticos que promueven el crecimiento óseo o inhiben la pérdida ósea actúan como agentes anticatabólicos (también conocidos comúnmente como "agentes catabólicos") (por ejemplo, bifosfonatos) o agentes anabólicos (por ejemplo, hormona paratiroidea, PTH, cuando se dosifica adecuadamente), la proteína soluble ActR11a exhibe doble actividad, teniendo efectos tanto anticatabólicos como anabólicos. Por lo tanto, la divulgación establece que los antagonistas de la vía de señalización activina-ActR11a pueden usarse para aumentar la densidad ósea y promover el crecimiento óseo. Si bien el ActR11a soluble puede afectar el hueso a través de un mecanismo diferente al antagonismo de la activina, la descripción demuestra que los agentes terapéuticos deseables pueden seleccionarse en función de una actividad antagonista de la activina-ActR11a. Como se describe en el presente documento, los antagonistas de activina-ActR11a son eficaces para prevenir y/o reparar el daño óseo causado por tumores de mieloma múltiple y tumores de mama, y, además, que los antagonistas de activina-ActR11a disminuyen la carga tumoral en el mieloma múltiple. El polipéptido ActR11a soluble promueve el crecimiento óseo sin causar un aumento medible constante en la masa muscular. Aquí se describen métodos para usar antagonistas de activina-ActR11a, que incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ActR11a que se unen a activina, anticuerpos anti-activina, anticuerpos anti-ActR11a, pequeñas moléculas y aptámeros dirigidos a activina o ActR11a, y ácidos nucleicos que disminuyen la expresión de activina y ActR11a, para tratar trastornos asociados con baja densidad ósea o baja resistencia ósea, como la osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes que lo necesitan, como en pacientes con fractura ósea.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden un polipéptido ActR11a soluble, que se une a activina. Los polipéptidos ActR11a pueden formularse como una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido ActR11a de unión a activina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el polipéptido ActR11a de unión a activina se une a activina con un KD menor que 1 micromolar o menor que 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActR11a de unión a activina se une selectivamente a activina frente a GDF11 y/o GDF8, y preferiblemente con un KD que es al menos 10 veces, 20 veces o 50 veces menor con respecto a la activina que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Si bien no desea limitarse a un mecanismo de acción particular, se espera que este grado de selectividad para la inhibición de la activina sobre la inhibición de GDF11/GDF8 tenga en cuenta el efecto selectivo sobre el hueso sin un efecto medible de manera consistente sobre el músculo.

Se puede seleccionar el polipéptido ActR11a por causar menos del 15%, menos del 10% o menos del 5% de aumento en el músculo a dosis que logren efectos deseables sobre el hueso. Preferiblemente, la composición es al menos 95% pura, con respecto a otros componentes de polipéptidos, según se evalúa por cromatografía de exclusión por tamaño, y más preferiblemente, la composición es al menos 98% pura. Un polipéptido ActR11a de unión a activina para usar en la invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos que sea al menos 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 fusionada a Fc. El polipéptido ActR11a de unión a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActR11a natural, tal como una secuencia de SEQ ID NO: 2, que carece de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola").

Un polipéptido ActR11a soluble, que se une a activina, descrito en el presente documento puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) en relación con un polipéptido ActR11a natural. Se proporcionan ejemplos de polipéptidos ActR11a alterados en el documento WO 2006/012627, págs. 59-60. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación

del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIa natural.

5 Un polipéptido ActRIIa de unión a activina descrito en el presente documento puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIa (por ejemplo, una porción de unión a ligando de un ActRII4a) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tales como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, focalización en tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar uno o más de la estabilidad in vivo, vida media in vivo, absorción/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos de proteínas, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. La dimerización o multimerización puede proporcionar una mayor afinidad de unión al ligando. Una proteína de fusión ActRIIa que se une a activina puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina de suero u otra porción de polipéptido que proporciona propiedades deseables tales como farmacocinética mejorada, solubilidad mejorada o estabilidad mejorada. Típicamente, una proteína de fusión ActRIIa-Fc se producirá como un complejo homodimérico. Opcionalmente, una fusión ActRIIa-Fc comprende un conector relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio extracelular ActRIIa. Este conector no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIa (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos ácidos o una longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria, o una mezcla de ambos. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una única secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias repetitivas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones TC₄ o SG₄). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, como una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIa soluble incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una unidad estructural lipídica y un aminoácido conjugado con un agente derivante orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales, como un compuesto que se usa para tratar un trastorno óseo. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una proteína ActRIIa se exprese en una línea celular de mamífero que media la glucosilación natural adecuada de la proteína ActRIIa para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente. 30 Las líneas celulares humanas y CHO se han usado con éxito, y se espera que otros sistemas de expresión de mamíferos comunes sean útiles.

Como se describe en el presente documento, las proteínas ActRIIa designadas ActRIIa-Fc tienen propiedades deseables, incluida la unión selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11, unión a ligando de alta afinidad y vida media en suero mayor de dos semanas en modelos animales. Los polipéptidos ActRIIa-Fc y las preparaciones farmacéuticas que comprenden dichos polipéptidos y un excipiente farmacéuticamente aceptable se describen en el presente documento. Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble se describen en el presente documento. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido ActRIIa soluble, que se une a activina, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un ActRIIa y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRIIa, pero para un codón de parada posicionado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótidos ActRIIa de longitud completa tal como SEQ ID NO: 4 o 5, o una versión parcialmente truncada, dicho polinucleótido aislado que además comprende un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del terminal 3'- o de otro modo colocado de tal manera que la traducción del polinucleótido da lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIa de longitud completa. Una secuencia de ácidos nucleicos es la SEQ ID NO: 14. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden unirse operativamente a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO. 50

En el presente documento también se describen métodos para preparar un polipéptido ActRIIa soluble que se une a activina. Tal método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5 o 14) descritos aquí en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Tal método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIa soluble, en donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de ActRIIa soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRIIa soluble así expresado. Los polipéptidos ActRIIa solubles pueden recuperarse como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación se puede lograr mediante una serie de etapas de purificación, que incluyen, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q sefarosa), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. 60

Un antagonista de activina-ActRIIa descrito en este documento, tal como un polipéptido de ActRIIa soluble que se une a activina, puede usarse en un método para promover el crecimiento óseo o aumentar la densidad ósea en un sujeto. Un método para tratar un trastorno asociado con baja densidad ósea, o para promover el crecimiento óseo, en 65

pacientes que lo necesiten puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de antagonista de activina-ActR1Ia. También se describen usos del antagonista de activina-ActR1Ia para hacer un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en el presente documento.

- 5 Un método para identificar un agente que estimula el crecimiento o el aumento de la mineralización del hueso puede comprender: a) identificar un agente de prueba que se une a la activina o un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActR1Ia; y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento o la mineralización del hueso.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra la purificación de ActR1Ia-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un pico único y bien definido.

La Figura 2 muestra la unión de ActR1Ia-hFc a activina y GDF-11, medido por el ensayo BiaCore™.

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

- 20 La Figura 4 muestra los efectos de ActR1Ia-hFc (diamantes) y ActR1Ia-mFc (cuadrados) sobre la señalización de GDF-8 en el ensayo del gen informador A-204. Ambas proteínas exhibieron una inhibición sustancial de la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares.

- 25 La figura 5 muestra los efectos de tres preparaciones diferentes de ActR1Ia-hFc sobre la señalización de GDF-11 en el ensayo del gen informador A-204.

- 30 La Figura 6 muestra ejemplos de imágenes DEXA de ratones BALB/c tratados con ActR1Ia-mFc, antes (paneles superiores) y después (paneles inferiores) del período de tratamiento de 12 semanas. Un sombreado más pálido indica una mayor densidad ósea.

- 35 La Figura 7 muestra una cuantificación de los efectos de ActR1Ia-mFc sobre la densidad mineral ósea en ratones BALB/c durante el período de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (diamantes), dosificación de 2 mg/kg de ActR1Ia-mFc (cuadrados), dosificación de 6 mg/kg de ActR1Ia-mFc (triángulos) y dosificación de 10 mg/kg de ActR1Ia-mFc (círculos).

- 40 La Figura 8 muestra una cuantificación de los efectos de ActR1Ia-mFc sobre el contenido mineral óseo en ratones BALB/c durante el período de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (diamantes), dosificación de 2 mg/kg de ActR1Ia-mFc (cuadrados), dosificación de 6 mg/kg de ActR1Ia-mFc (triángulos) y dosificación de 10 mg/kg de ActR1Ia-mFc (círculos).

- 45 La Figura 9 muestra una cuantificación de los efectos de ActR1Ia-mFc sobre la densidad mineral ósea del hueso trabecular en ratones C57BL6 ovariectomizados (OVX) o simulados (SHAM) durante un período de 6 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS) o dosis de 10 mg/kg de ActR1Ia-mFc (ActR1Ia).

- La Figura 10 muestra una cuantificación de los efectos de ActR1Ia-mFc sobre el hueso trabecular en ratones C57BL6 ovariectomizados (OVX) durante un período de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS; barras pálidas) o dosis de 10 mg/kg de ActR1Ia-mFc (ActR1Ia; barras oscuras).

- 50 La Figura 11 muestra una cuantificación de los efectos de ActR1Ia-mFc sobre el hueso trabecular en ratones C57BL6 operados simulados después de 6 o 12 semanas de período de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS; barras pálidas) o dosis de 10 mg/kg de ActR1Ia-mFc (ActR1Ia; barras oscuras).

- 55 La Figura 12 muestra los resultados del análisis pQCT de la densidad ósea en ratones ovariectomizados durante 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS; barras pálidas) o ActR1Ia-mFc (barras oscuras). eje y: mg/ccm.

- 60 La Figura 13 representa los resultados del análisis pQCT de la densidad ósea en ratones operados simulados durante 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS; barras pálidas) o ActR1Ia-mFc (barras oscuras). eje y; mg/ccm.

Las Figuras 14A y 14B muestran el análisis DEXA de todo el cuerpo después de 12 semanas de tratamiento (A) y el análisis ex vivo de fémures (B). Las áreas claras representan áreas de alta densidad ósea.

- 65 La Figura 15 muestra el análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control de vehículo (PBS, barras oscuras) y ActR1Ia-mFc (barras pálidas). Las cuatro barras a la

izquierda muestran la densidad ósea total, mientras que las cuatro barras a la derecha muestran la densidad ósea cortical. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representan datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa datos de ratones operados simulados.

5 La Figura 16 muestra el análisis ex vivo de pQCT y el contenido de hueso diafisario del eje medio femoral después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control de vehículo (PBS, barras oscuras) o ActRlla-mFc (barras pálidas). Las cuatro barras a la izquierda muestran el contenido total de hueso, mientras que las cuatro barras a la derecha muestran el contenido de hueso cortical. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representan datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa datos de ratones operados simulados.

15 La Figura 17 muestra el análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral y el grosor cortical femoral. Los tratamientos fueron control (PBS, barras oscuras) y ActRlla-mFc (barras pálidas). Las cuatro barras a la izquierda muestran la circunferencia endosteal, mientras que las cuatro barras a la derecha muestran la circunferencia perióstica. El primer par de barras en cada conjunto de cuatro barras representan datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa datos de ratones operados simulados.

20 La Figura 18 muestra los resultados de las pruebas mecánicas de fémures después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS, barras oscuras) y ActRlla-mFc (barras pálidas). Las dos barras a la izquierda representan datos de ratones ovariectomizados, mientras que las dos últimas barras representan datos de ratones operados simulados.

La Figura 19 muestra los efectos de Actrlla-mFc sobre el volumen óseo trabecular.

25 La Figura 20 muestra los efectos de Actrlla-mFc sobre la arquitectura trabecular en el fémur distal.

La Figura 21 muestra los efectos de Actrlla-mFc sobre el hueso cortical.

30 La Figura 22 muestra los efectos de Actrlla-mFc sobre la resistencia mecánica del hueso.

La Figura 23 muestra los efectos de diferentes dosis de ActRlla-mFc sobre las características del hueso en tres dosis diferentes.

35 La Figura 24 muestra la histomorfometría ósea que indica que ActRlla-mFc tiene doble actividad anabólica y antirresortiva.

La Figura 25 muestra datos histomorfométricos adicionales.

40 La Figura 26 muestra imágenes de fémures de ratones de ratones ingenuos y portadores de tumores, y los efectos del tratamiento con ActRlla-mFc sobre la morfología ósea en el modelo de mieloma múltiple. Los ratones que portan tumores de mieloma múltiple (5T2) muestran picaduras marcadas y degradación en el hueso en relación con los ratones normales (sin tratamiento previo). El tratamiento con ActRlla-mFc elimina este efecto.

45 La Figura 27 muestra los resultados del ensayo clínico en humanos descrito en el Ejemplo 5, donde el área bajo la curva (AUC) y la dosis administrada de ActRlla-hFc tienen una correlación lineal, independientemente de si ActRlla-hFc se administró por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC).

50 La Figura 28 muestra una comparación de los niveles séricos de ActRlla-hFc en pacientes administrados por vía IV o SC.

La Figura 29 muestra los niveles de fosfatasa alcalina ósea (BAP) en respuesta a diferentes niveles de dosis de ActRlla-hFc. BAP es un marcador para el crecimiento óseo anabólico.

55 La Figura 30 muestra los efectos cooperativos de ActRlla-mFc (RAP-011) y un agente de bisfosfonato (zoledronato) en ratones.

Descripción detallada de la invención

1. Información general

60 La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células

epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activin/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Al manipular la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas bovinas piemontesas y belgas azules llevan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que causa un marcado aumento en la masa muscular. Grobet et al., *Nat Genet.* 1997, 17(1): 71-4. Además, en humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con un aumento de la masa muscular y, según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004, 350: 2682-8.

Las activinas son factores de crecimiento de polipéptidos diméricos que pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta\beta_A$, $\beta\beta_B$ y $\beta\beta_{AB}$). El genoma humano también codifica una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado. En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular de manera positiva o negativa dependiendo del tipo de célula e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios. (DePaolo et al., 1991, *Proc Soc Ep Biol Med.* 198: 500-512; Dyson et al., 1997, *Curr Biol.* 7: 81-84; Woodruff, 1998, *Biochem Pharmacol.* 55: 953-963). Además, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (FED) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata et al., 1988, *PNAS*, 85: 2434). Se ha sugerido que la activina A actúa como un regulador natural y positivo de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina previene la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de activina y/o unirse a activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP) y α_2 -macroglobulina.

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

Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIa y ActRIIb, como los receptores de tipo II para activinas (Mathews and Vale, 1991, *Cell* 65: 973-982; Attisano et al., 1992, *Cell* 68: 97-108) Además de las activinas, ActRIIa y ActRIIb pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF- β , incluidas BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., 1995, *J. Cell Biol.* 130: 217-226; Lee and McPherron, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, *Mol. Cell* 7: 949-957; Oh et al., 2002, *Genes Dev.* 16: 2749-54). ALK4 es el receptor primario de tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como receptor para las activinas, particularmente para la activina B.

Como se demuestra aquí, un polipéptido ActRIIa soluble (sActRIIa), que muestra una preferencia sustancial en la unión a activina A en oposición a otros miembros de la familia TGF-beta, como GDF8 o GDF11, es eficaz para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea en vivo. Si bien no desea estar vinculado a ningún mecanismo en particular, se espera que el efecto de sActRIIa sea causado principalmente por un efecto antagonista de activina, dada la muy fuerte unión a activina (constante de disociación picomolar) exhibida por la construcción particular de sActRIIa utilizada en estos estudios. Independientemente del mecanismo, es evidente a partir de los datos presentados en el presente documento que los antagonistas de ActRIIa-activina aumentan la densidad ósea en ratones normales, en modelos de ratón para osteoporosis y en un modelo de mieloma múltiple en ratón. Cabe señalar que el hueso es un tejido dinámico, con crecimiento o contracción y densidad aumentada o disminuida dependiendo de un equilibrio de factores que producen hueso y estimulan la mineralización (principalmente osteoblastos) y factores que destruyen y desmineralizan el hueso (principalmente osteoclastos). El crecimiento óseo y la mineralización pueden incrementarse aumentando los factores productivos, disminuyendo los factores destructivos, o ambos. Los términos "promover el crecimiento óseo" y "aumentar la mineralización ósea" se refieren a los cambios físicos observables en el hueso y pretenden ser neutrales en cuanto al mecanismo por el cual ocurren los cambios en el hueso.

Los modelos de ratón para osteoporosis y densidad/crecimiento óseo que se usaron en los estudios descritos en el presente documento se consideran altamente predictivos de eficacia en humanos, y por lo tanto, los polipéptidos ActRIIa y otros antagonistas de activina-ActRIIa pueden usarse para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea en humanos. Los antagonistas de activina-ActRIIa incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIa solubles que se unen a activina, anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades de activina A o B, también denominadas β_A o β_B) e interrumpen la unión de ActRIIa, anticuerpos que se unen a ActRIIa e interrumpen proteínas de unión a activina, no anticuerpos seleccionadas para la unión a activina o ActRIIa (véanse, por ejemplo, WO/2002/088171, WO/2006/055689 y WO/2002/032925 para ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y selección de tales reactivos de unión por afinidad de anticuerpos) y péptidos aleatorios seleccionados para la unión de activina o ActRIIa, a menudo fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otras unidades estructurales) con

actividad de unión a activina o ActRIIa, especialmente aglutinantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (por ejemplo, un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir para crear una molécula de unión bifuncional. Los aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización activina-ActRIIa. Varias proteínas tienen actividad antagonista de activina-ActRIIa, incluida la inhibina (es decir, la subunidad alfa de inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente la activina en todos los tejidos, folistatina (por ejemplo, Folistatina-288 y folistatina-315), FSRP, activina C, alfa(2)-macroglobulina y una activina A mutante M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). Generalmente, las formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión al receptor de tipo I pueden unirse a los receptores de tipo II y no pueden formar un complejo ternario activo, actuando, así como antagonistas. Además, los ácidos nucleicos, como las moléculas antisentido, los ARNs i o las ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, en particular, la expresión de ActRIIa, pueden usarse como antagonistas de activina-ActRIIa. Preferiblemente, el antagonista de activina-ActRIIa que se usará exhibirá selectividad para inhibir la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11. Las proteínas ActRIIb solubles se unen a la activina, sin embargo, la proteína de tipo salvaje no exhibe una selectividad significativa en la unión a la activina frente a GDF8/11, y los experimentos preliminares sugieren que esta proteína no proporciona los efectos deseados en el hueso, mientras que también causa un crecimiento muscular sustancial. Sin embargo, se han identificado formas alteradas de ActRIIb con diferentes propiedades de unión (véase, por ejemplo, WO 2006/012627, págs. 55-59 y estas proteínas pueden lograr los efectos deseados en el hueso. Se puede dar especificidad adicional a ActRIIb nativo o alterado para activina mediante acoplamiento con un segundo agente de unión selectivo a activina.

Los términos usados en esta especificación generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se analizan a continuación o en otra parte de la especificación, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y cómo hacerlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en donde se use el término.

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

Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas aquí son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" puede inferirse cuando no se indica expresamente.

Las secuencias se pueden comparar entre sí, incluida la secuencia de tipo salvaje con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). El experto en la materia puede apreciar fácilmente que, en tales alineamientos, donde una mutación contiene una inserción o eliminación de residuos, la alineación de secuencia introducirá una "brecha" (típicamente representado por un guion o "A") en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

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

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

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

2. Polipéptidos ActRIIa

Como se usa en el presente documento, el término "ActRIIa" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIa (ActRIIa) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIa por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIa en el presente documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIa son generalmente proteínas transmembrana,

compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasa predicha.

5 El término "polipéptido ActR11a" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActR11a, así como cualquier variante del mismo (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActR11a incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActR11a conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActR11a, y preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a puede unirse e inhibir la función de una proteína y/o activina ActR11a. Preferiblemente, un polipéptido ActR11a promueve el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Ejemplos de polipéptidos ActR11a incluyen el polipéptido precursor ActR11a humana (SEQ ID NO: 1) y los polipéptidos ActR11a humanas solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7 y 12).

15 La secuencia de proteína precursora de ActR11a humana es la siguiente:

MGAAAKLAFAVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
E**V****Y****F****C****C****C****E****G****N****M****C****N****E****K****F****S****Y****F****P****E****M****E****V****T****Q****P****T****S****N****P****V****T****P****K****P****P****Y****Y****N****I****L****L****Y****S****L****V****P****L**
M**L****I****A****G****I****V****I****C****A****F****W****V****R****R****H****K****M****A****Y****P****P****V****L****V****P****T****Q****D****P****G****P****P****P****S****P****L****L****G****L****K****P****L****Q****L****L****E**
V**K****A****R****G****R****F****G****C****V****W****K****A****Q****L****L****N****E****Y****V****A****V****K****I****F****P****I****Q****D****K****Q****S****W****Q****N****E****Y****E****V****Y****S****L****P****G****M****K****H****E****N**
I**L****Q****F****I****G****A****E****K****R****G****T****S****V****D****V****D****L****W****L****I****T****A****F****H****E****K****G****S****L****S****D****F****L****K****A****N****V****V****S****W****N****E****L****C****H****I****A****E**
T**M****A****R****G****L****A****Y****L****H****E****D****I****P****G****L****K****D****G****H****K****P****A****I****S****H****R****D****I****K****S****K****N****V****L****L****K****N****N****L****T****A****C****I****A****D****F****G****L**
A**L****K****F****E****A****G****K****S****A****G****D****T****H****G****Q****V****G****T****R****R****Y****M****A****P****E****V****L****E****G****A****I****N****F****Q****R****D****A****F****L****R****I****D****M****Y****A****M****G****L**
V**L****W****E****L****A****S****R****C****T****A****A****D****G****P****V****D****E****Y****M****L****P****F****E****E****E****I****G****Q****H****P****S****L****E****D****M****Q****E****V****V****V****H****K****K****R****P****V****L**
R**D****Y****W****Q****K****H****A****G****M****A****M****L****C****E****T****I****E****C****W****D****H****D****A****E****A****R****L****S****A****G****C****V****G****E****R****I****T****Q****M****Q****R****L****T****N****I****I****T**
T**E****D****I****V****T****V****V****T****M****V****T****N****V****D****F****P****P****K****E****S****S** (SEQ ID NO: 1)

20 El péptido de señalización está subrayado individualmente; el dominio extracelular está en negrita y los posibles sitios de glicosilación unidos a N están doblemente subrayados.

La secuencia de polipéptidos procesados solubles en ActR11a humana (extracelular) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

25 La "cola" del terminal C del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM (SEQ ID NO:3)

30 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína precursora de ActR11a humana es la siguiente (nucleótidos 164-1705 de la entrada de Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
ACAGAACCAATCAAACTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAACGGCGGCAT
TGTTTGCTACTTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTG

ES 2 756 725 T3

GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
GAGATGGAAGTCACACAGCCCCTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAA
CATCCTGCTCTATTCCCTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCCTCAACTCAAGAC
CCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
CTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC
AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG
CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTAT
CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAACTGTGTTCATTTGCAGAAACC
ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
TATAAACTTCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
TATGGGAAGTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
GCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
TGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA
GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTA
GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido soluble (extracelular) ActR11a humana es la siguiente:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA
CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGG
CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG
AGATGGAAGTCACACAGCCCCTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACC (SEQ ID
NO: 5)

5

10

15

Como se describe en el presente documento, el término "polipéptido ActR11a soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActR11a. El término "polipéptido ActR11a soluble", como se usa en el presente documento, incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActR11a, así como cualquier variante de la misma (incluidos mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActR11a de unión a activina es uno que retiene la capacidad de unirse a activina, particularmente activina AA, AB o BB. Preferiblemente, un polipéptido ActR11a de unión a activina se unirá a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menos. Las secuencias de aminoácidos de la proteína precursora de ActR11a humana se proporcionan a continuación. El dominio extracelular de una proteína ActR11a se une a la activina y generalmente es soluble, y por lo tanto puede denominarse un polipéptido ActR11a soluble que se une a la activina. Ejemplos de polipéptidos de ActR11a solubles que se unen a activina incluyen el polipéptido soluble ilustrado en las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 y 13. La SEQ ID NO: 7 se denomina ActR11a-hFc, y se describe adicionalmente en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActR11a solubles que se unen a activina comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una

proteína ActRIIa, por ejemplo, la secuencia guía de miel de abeja melitina (SEQ ID NO: 8), la guía del activador de plaminógeno tisular (TPA) (SEQ ID NO: 9) o la guía nativa de ActRIIa (SEQ ID NO: 10). El polipéptido ActRIIa-hFc ilustrado en SEQ ID NO: 13 usa una guía TPA.

5 Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de los polipéptidos ActRIIa seleccionando polipéptidos producidos por vía recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIa. Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como la química convencional Merrifield en fase sólida f-Moc o t-Boc. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o por síntesis química) y probarse para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIa o la señalización mediada por activina.

10 Se pueden obtener variantes funcionalmente activas de los polipéptidos ActRIIa seleccionando bibliotecas de polipéptidos modificados producidos por vía recombinante a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido ActRIIa. Las variantes se pueden producir y probar para identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIa o señalización mediada por activina. Una variante funcional de los polipéptidos ActRIIa puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2 o 3.

15 Se pueden generar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRIIa para fines tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Dichos polipéptidos ActRIIa modificados cuando se seleccionan para retener la unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIa de origen natural. Los polipéptidos ActRIIa modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, eliminación o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrán un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIa da como resultado un homólogo funcional evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIa variante para producir una respuesta en las células de manera similar al polipéptido ActRIIa de tipo salvaje.

20 Se pueden incluir mutaciones específicas en los polipéptidos ActRIIa para alterar la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación unidos a O o N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptidos, asparagina-X-treonina (o asparaginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por las enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIa de tipo salvaje (para sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera o tercera de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o eliminación de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glucosilación en la secuencia de tripéptidos modificada. Otro medio de aumentar el número de unidades estructurales de carbohidratos en un polipéptido ActRIIa es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRIIa. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el (los) azúcar(s) 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) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., Págs. 259-306.

25 La eliminación de una o más unidades estructurales de carbohidratos presentes en un polipéptido ActRIIa se puede lograr química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIa 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 de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys 259: 52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de unidades estructurales de carbohidratos en los polipéptidos ActRIIa se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol 138: 350. La secuencia de un polipéptido ActRIIa se puede ajustar, según corresponda, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIa para uso en humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glucosilación adecuada, como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión en mamíferos, líneas celulares de levadura con enzimas de glucosilación diseñadas y células de insecto también sean útiles.

Esta descripción contempla además un método para generar mutantes, particularmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIa, así como mutantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El propósito de seleccionar tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIa que puedan actuar como agonistas o antagonistas, o alternativamente, que posean actividades novedosas juntas. A continuación, se proporciona una variedad de ensayos de detección, y dichos ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRIIa puede seleccionarse para determinar su capacidad para unirse a un ligando ActRIIa, para evitar la unión de un ligando ActRIIa a un polipéptido ActRIIa o para interferir con la señalización causada por un ligando ActRIIa.

La actividad de un polipéptido ActRIIa o sus variantes también se puede probar en un ensayo basado en células o in vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRIIa en la expresión de genes implicados en la producción ósea o la destrucción ósea. Esto puede, según sea necesario, realizarse en presencia de una o más proteínas recombinantes de ligando ActRIIa (por ejemplo, activina), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido ActRIIa y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando ActRIIa. Asimismo, un polipéptido ActRIIa se puede administrar a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más propiedades óseas, como la densidad o el volumen. La tasa de curación para fracturas óseas también se puede evaluar. La absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) es una técnica cuantitativa, no invasiva y bien establecida para evaluar la densidad ósea en un animal. En humanos, los sistemas centrales DEXA pueden usarse para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores predictores de la densidad ósea general. Los sistemas periféricos DEXA pueden usarse para evaluar la densidad ósea en los huesos periféricos, incluidos, por ejemplo, los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Los sistemas tradicionales de imágenes de rayos X, incluidas las tomografías computarizadas, pueden usarse para evaluar el crecimiento óseo y la curación de fracturas. La resistencia mecánica del hueso también se puede evaluar.

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o generalmente aumentada con respecto a un polipéptido ActRIIa natural. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen vidas medias intracelulares dramáticamente diferentes que el correspondiente polipéptido ActRIIa de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que provocan la destrucción o la inactivación de un polipéptido ActRIIa nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIa modulando la vida media de los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRIIa recombinante dentro del paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la vida media de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que cada uno incluye al menos una porción de secuencias potenciales de polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se puede ligar enzimáticamente en secuencias de genes de manera que el conjunto degenerado de secuencias potenciales de nucleótidos del polipéptido ActRIIa se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la presentación en fagos).

Hay muchas formas por las cuales la biblioteca de homólogos potenciales puede generarse a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador automático de ADN, y los genes sintéticos se unen en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res* 11:477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249: 386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89: 2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; así como las Patentes de los Estados Unidos Nos: 5,223,409, 5,198,346 y 5,096,815).

Como alternativa, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, las variantes de polipéptidos ActRIIa pueden generarse y aislarse de una biblioteca mediante cribado utilizando, por ejemplo, mutagénesis de exploración de alanina y similares (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137: 109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30: 10832-10838; and Cunningham et al., (1989) *Science* 244: 1081-1085), mediante mutagénesis de barrido de enlace (Gustin et al., (1993) *Virología* 193: 653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12: 2644-2652; McKnight et al., (1982) *Science* 232: 316); por mutagénesis por saturación (Meyers et al., (1986) *Science* 232: 613); por mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1: 11-19); o por mutagénesis aleatoria, incluida la mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; and Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7: 32-34). La mutagénesis de exploración de enlazador,

particularmente en un entorno combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIa.

5 Se conoce una amplia gama de técnicas en la técnica para seleccionar productos genéticos de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales y truncamientos, y, para el caso, para seleccionar bibliotecas de ADNc para productos genéticos que tienen una determinada propiedad. Dichas técnicas serán generalmente adaptables para la detección rápida de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos ActRIIa. Las técnicas más ampliamente utilizadas para el rastreo de grandes bibliotecas de genes típicamente comprenden clonar la biblioteca de genes 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 facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediados por activina.

15 En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa descritos en el presente documento pueden comprender además modificaciones postraduccion además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIa, tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIa modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIa se pueden probar como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptidos ActRIIa. Cuando se produce un polipéptido ActRIIa en células al escindir una forma naciente del polipéptido ActRIIa, el procesamiento postraduccion también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccion y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActRIIa.

Las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIa pueden incluir proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIa y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para fines de purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con asociados de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIa. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como las "etiquetas de epitopo", que generalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epitopos bien conocidas para las cuales los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de la proteasa, como el Factor Xa o la Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por lo tanto, libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse luego del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. Un polipéptido ActRIIa puede fusionarse con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIa in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumenta la vida media del suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución de la eliminación del riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a la albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, como una estimulación adicional del crecimiento óseo o muscular, según se desee).

Como ejemplo específico, una proteína de fusión puede comprender un dominio extracelular soluble de ActRIIa fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos 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) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fc γ en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad de unión al receptor Fc relacionado con MHC de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo salvaje.

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

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la vida media in vitro de los polipéptidos ActRIIa, mejoran la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIa o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIa. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIa y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un ActRIIa polipéptido), y modificaciones de la unidad estructural carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de unidades estructurales carbohidrato de un polipéptido ActRIIa). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIa se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas como una unidad estructural carbohidrato o un polímero no proteico, como el polietilenglicol.

Las formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIa pueden aislarse de otras proteínas o, de otro modo, estar sustancialmente libres de ellas. Los polipéptidos ActRIIa generalmente se producirán por expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIa

En el presente documento se describen ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIa (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles), incluidos fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en el presente documento. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor ActRIIa humana natural, mientras que la SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ActRIIa o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende que los ácidos nucleicos sujetos que codifican los polipéptidos ActRIIa incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 4 o 5. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, como las variantes alélicas.

En el presente documento también se describen secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la SEQ ID NO: 4 o 5. Un experto habitual en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 4 o 5, y se pueden proporcionar variantes de la SEQ ID NO: 4 o 5. Las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

Los ácidos nucleicos también pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente estrictas con la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 4 o 5, secuencia complementaria de SEQ ID NO: 4 o 5, o fragmentos de la misma. Como se discutió anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de restricción apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación a 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2.0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C hasta una alta rigurosidad de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

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

Los ácidos nucleicos recombinantes descritos en el presente documento pueden estar operativamente unidos a una o más secuencias reguladoras de nucleótidos en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas en la técnica para una variedad de células huésped. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladores pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencia guía o de señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación transcripcionales, secuencias de inicio y terminación de traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Se contemplan promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica.

Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada.

El ácido nucleico puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActR11a y puede unirse operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActR11a. En consecuencia, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras de ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActR11a. Dichas secuencias útiles de control de la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de la cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de levadura, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores antibióticos.

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

Algunos vectores de expresión en mamíferos contienen tanto secuencias procariontas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos tanto en células procariontas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden usarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedantes son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariontas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (como el β -gal que contiene pBlueBac III).

Se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActR11a objetivo en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, California), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, California) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise.). Como será evidente, los constructos de genes en cuestión pueden usarse para causar la expresión de los polipéptidos ActR11a en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

También se describe una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 o 5) para uno o más de los polipéptidos ActR11a sujetos. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

En el presente documento se describen métodos para producir los polipéptidos ActR11a sujetos. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActR11a puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActR11a. El polipéptido ActR11a puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActR11a. Alternativamente, el polipéptido ActR11a se puede retener citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActR11a sujetos 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 de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares. de los polipéptidos ActR11a y la purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido ActR11a (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActR11a-Fc). El polipéptido ActR11a puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. La purificación se puede lograr mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de regulador. Como se demuestra en el presente documento, la proteína ActR11a-hFc se purificó a una pureza >98% según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según lo determinado por SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

Un gen de fusión que codifica una secuencia guía de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N- de la porción deseada del polipéptido ActR11a recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad utilizando una resina de metal Ni^{2+} . La secuencia guía de la purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActR11a purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; y Janknecht et al., *PNAS USA* 88: 8972).

Las técnicas para hacer genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando terminales con extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Antagonistas alternativos de activina y ActR11a

Los datos presentados en el presente documento demuestran que los antagonistas de la señalización de activina-ActR11a pueden usarse para promover el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Aunque la invención proporciona ciertos polipéptidos ActR11a solubles, y particularmente ActR11a-Fc, y aunque dichos antagonistas pueden afectar al hueso a través de un mecanismo diferente al antagonismo de activina (por ejemplo, la inhibición de activina puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de moléculas, incluidos, quizás, otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y dicha inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado sobre el hueso), se espera que otros tipos de antagonistas de activina-ActR11a sean útiles, incluida la anti-activina (por ejemplo, A, B, C o E), anticuerpos anti-ActR11a, antisentido, ARNi o ácidos nucleicos de ribozima que inhiben la

producción de ActRIIa y otros inhibidores de activina o ActRIIa, particularmente aquellos que interrumpen la unión de activina-ActRIIa.

Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIa (por ejemplo, un polipéptido ActRIIa soluble) y que se une competitivamente al ligando con el polipéptido ActRIIa o inhibe la señalización mediada por ActRIIa puede usarse como un antagonista de las actividades del polipéptido ActRIIa. Del mismo modo, un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido de activina A y que interrumpe la unión de ActRIIa puede usarse como un antagonista.

Mediante el uso de inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIa o un polipéptido de activina, los antisueros antiproteína/antipéptido o los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, como un ratón, un hámster o un conejo puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido ActRIIa, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen la conjugación con portadores u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Se puede administrar una porción inmunogénica de un polipéptido ActRIIa o activina en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede controlarse mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. El ELISA estándar u otros inmunoensayos pueden usarse con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIa, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recolectar de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizantes como las células de mieloma para producir células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. págs. 77-96). Las células de hibridoma pueden seleccionarse inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIa y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido sujeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos pueden seleccionarse por utilidad de la misma manera que se describe anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)₂ pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro a los fragmentos Fab del producto. Los anticuerpos descritos en el presente documento pretenden además incluir moléculas biespecíficas, de cadena sencilla, quiméricas, humanizadas y completamente humanas que tienen afinidad por un polipéptido ActRIIa o activina conferido por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede comprender además un marcador unido al mismo y capaz de ser detectado (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor enzimático).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante, término que abarca cualquier anticuerpo generado en parte por técnicas de biología molecular, incluidos los anticuerpos quiméricos o injertados con CDR, anticuerpos humanos u otros ensamblados a partir de dominios de anticuerpos seleccionados en la biblioteca, anticuerpos de cadena sencillos y anticuerpos de dominio sencillos (por ejemplo, proteínas VH humanas o proteínas VHH camélidas). El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, y aquí se describen métodos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActRIIa o un polipéptido de activina puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido antigénico eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obteniendo células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) de ratón y fusionando las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y probando los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo celular.

El adjetivo "específicamente reactivo con" como se usa en referencia a un anticuerpo pretende significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido ActRIIa) y otros antígenos que no son de interés para los que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de un anticuerpo: la interacción del antígeno es la afinidad

del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con un rango de afinidades diferentes, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menos. Dada la unión extraordinariamente estrecha entre activina y ActRIIa, se espera que un anticuerpo neutralizante anti-activina o anti-ActRIIa generalmente tenga una constante de disociación de 10^{-10} o menos.

Además, las técnicas utilizadas para seleccionar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unir un antígeno en solución, puede ser deseable probar la unión a la solución. Está disponible una variedad de técnicas diferentes para probar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos tipo sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunotransferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

Ejemplos de categorías de compuestos de ácidos nucleicos que son activina o antagonistas de ActRIIa incluyen ácidos nucleicos antisentido, constructos de ARNi y constructos de ácido nucleico catalítico. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto bicatenario también puede incluir regiones de saliente o no complementariedad, donde uno u otro de los filamentos es monocatenario. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de auto complementariedad, lo que significa que el compuesto forma una estructura denominada "horquilla" o "bucle de tallo", con una región de estructura helicoidal doble. Un compuesto de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región que consiste en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 30, 25, 22, 20 o 18 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ActRIIa de longitud completa o la secuencia de ácidos nucleicos de activina β A o activina β B. La región de complementariedad será 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 caer dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no codificante de la transcripción diana, tal como la porción de secuencia codificante. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y opcionalmente la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para uso como antisentido), ARN o ARN:ADN híbrido. Cualquier cadena puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Del mismo modo, un compuesto de doble cadena puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN, y cualquier cadena también puede incluir 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, incluida una o modificaciones en la cadena principal (la porción de azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluidos los enlaces internucleotídicos) o la porción de base (la porción de purina o pirimidina de un nucleico natural ácido). Un compuesto de ácido nucleico antisentido tendrá preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y a menudo contendrá una o más modificaciones para mejorar características tales como la estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar donde es probable que se entregue el compuesto, como el estómago en el caso de compuestos administrados por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de una construcción de ARNi, la cadena complementaria a la transcripción objetivo generalmente será ARN o modificaciones de la misma. La otra cadena puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción dúplex de la construcción de ARNi de "horquilla" bicatenaria o monocatenaria tendrá preferiblemente una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, siempre que sirva como 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 en aproximadamente un 50%, 75%, 90% o más cuando se ponen en contacto con células en condiciones fisiológicas y a una concentración en donde un control sin sentido o sentido tiene poco o ningún efecto. Las concentraciones preferidas para probar el efecto de los compuestos de ácidos nucleicos son 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácidos nucleicos también pueden analizarse para determinar sus efectos sobre, por ejemplo, el crecimiento óseo y la mineralización.

5. Ensayos de detección

Los polipéptidos ActRIIa (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles) y los polipéptidos activina pueden usarse para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la ruta de señalización activina-ActRIIa. Los compuestos identificados a través de este examen pueden ser probados para evaluar su capacidad para modular el crecimiento óseo o la mineralización in vitro. Opcionalmente, estos compuestos pueden probarse adicionalmente en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido in vivo.

Existen numerosas metodologías para la detección de agentes terapéuticos para modular el crecimiento de tejido dirigiéndose a los polipéptidos de activina y ActRIIa. Se puede llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de los compuestos para identificar agentes que perturben la activina o los efectos mediados por ActRIIa sobre el hueso. En ciertos casos, el ensayo se lleva a cabo para seleccionar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. Alternativamente, el ensayo puede usarse para

identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActR11a a activina. Los compuestos se pueden identificar por su capacidad de interactuar con una activina o un polipéptido ActR11a.

Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente descripción, los que no se describen expresamente en el presente documento serán comprendidos por un experto en la materia. Como se describe en el presente documento, los compuestos de prueba (agentes) pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos sujetos pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) que se analizarán para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento de tejidos pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos peptidomiméticos), o producido de forma recombinante. Los compuestos de prueba incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En un caso específico, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 daltons.

Los compuestos de prueba pueden proporcionarse como entidades individuales, discretas, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tal como las preparadas por química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en los pasos iniciales de selección. Opcionalmente, los compuestos pueden derivarse opcionalmente con otros compuestos y tener grupos de derivación que faciliten el aislamiento de los compuestos. Ejemplos no limitantes de grupos derivantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticuladores fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de detección de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos estudiados en un período de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, como los que pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como pantallas "primarias", ya que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en un blanco molecular que está mediado por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de prueba generalmente se pueden ignorar en el sistema in vitro, y el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco en el objetivo molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActR11a y activina.

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado de ejemplo, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActR11a aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a activina. A la mezcla del compuesto y polipéptido ActR11a se le añade una composición que contiene un ligando ActR11a. La detección y cuantificación de los complejos ActR11a/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido ActR11a y la activina. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se agrega activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActR11a, y la formación del complejo ActR11a/activina se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en que se pueden mezclar los reactivos se puede variar, y se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden usarse extractos celulares y lisados para proporcionar un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación de complejos entre el polipéptido ActR11a y la activina puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, como las radiomarcadas (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C o ³H), marcadas con fluorescencia (por ejemplo, FITC) o el polipéptido ActR11a o la activina marcadas enzimáticamente, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

Se pueden usar ensayos de polarización de fluorescencia y los ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActR11a y su proteína de unión. Además, se pueden usar otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y Patente de los Estados Unidos No. 5,677,196), resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial.

Un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", puede usarse para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido ActR11a y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72: 223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696). Se pueden usar dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActR11a y su proteína de unión. Véanse, por

ejemplo, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17: 374-81; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

Los compuestos en cuestión pueden identificarse por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActR11a o activina descrito aquí. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActR11a o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de proteína utilizando métodos bioquímicos in vitro, que incluyen fotoentrecruzamiento, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden seleccionarse en un ensayo basado en un mecanismo, como un ensayo para detectar compuestos que se unen a una activina o un polipéptido ActR11a. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica una activina o un polipéptido ActR11a puede transfectarse con un sistema indicador (por ejemplo, B-galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y seleccionarse contra la biblioteca preferiblemente mediante un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con el objetivo fijado a un pozo, perla o chip o capturado por un anticuerpo inmovilizado o resuelto por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse usualmente usando resonancia colorimétrica o fluorescente o de plasmón superficial.

En el presente documento se describen métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación ósea y aumentar la masa ósea. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede analizarse en células o tejidos completos, in vitro o in vivo, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento óseo o la mineralización. Se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica para este propósito.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActR11a o activina o los compuestos de prueba sobre el crecimiento óseo o cartilaginoso puede determinarse midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos basados en células (véase, por ejemplo, Daluiski et al., *Nat Genet.* 2001, 27(1): 84-8; Hino et al., *Front Biosci.* 2004, 9: 1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye el análisis de la actividad osteogénica del sujeto ActR11a o polipéptidos de activina y compuestos de prueba en células progenitoras mesenquimatosas y osteoblásticas. Para ilustrar, los adenovirus recombinantes que expresan una activina o un polipéptido ActR11a pueden construirse para infectar células progenitoras mesenquimales pluripotentes C3H10T1/2, células C2C12 preosteoblásticas y células TE-85 osteoblásticas. La actividad osteogénica se determina midiendo la inducción de fosfatasa alcalina, osteocalcina y mineralización de la matriz (véase, por ejemplo, Cheng et al., *J bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8): 1544-52).

Pueden usarse ensayos in vivo para medir el crecimiento de hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., *Bone*, 28: 80-86 (2001) describe un modelo osteoporótico de rata en donde se estudia la reparación ósea durante el período inicial después de la fractura. Kubo et al., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68: 197-202 (1999) también describe un modelo osteoporótico de rata en donde se estudia la reparación ósea durante el último período después de la fractura. Andersson et al., *J. Endocrinol.* 170: 529-537 describen un modelo de osteoporosis de ratón en donde los ratones se ovariectomizan, lo que hace que los ratones pierdan un contenido mineral óseo sustancial y una densidad mineral ósea, perdiendo el hueso trabecular aproximadamente el 50% de la densidad mineral ósea. La densidad ósea podría incrementarse en los ratones ovariectomizados mediante la administración de factores como la hormona paratiroidea. Se pueden usar ensayos de curación de fracturas conocidos en la técnica. Estos ensayos incluyen técnicas de fractura, análisis histológicos y análisis bioquímicos, que se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6,521,750, que describe protocolos experimentales para causar y medir la extensión de fracturas y el proceso de reparación.

6. Usos terapéuticos de ejemplo

Los antagonistas de activina-ActR11a (por ejemplo, polipéptidos ActR11a) pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección que está asociada con daño óseo, ya sea, por ejemplo, por rotura, pérdida o desmineralización. Como se demuestra en este documento, los antagonistas de activina-ActR11a, y particularmente los componentes de ActR11a-Fc, son efectivos para tratar o prevenir la pérdida ósea relacionada con el cáncer. Aquí se describen métodos para tratar o prevenir el daño óseo en un individuo que lo necesite mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de activina-ActR11a, particularmente un polipéptido ActR11a. También se describen métodos para promover el crecimiento óseo o la mineralización en un individuo que lo necesita mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de activina-ActR11a, particularmente un polipéptido ActR11a. Estos métodos están dirigidos preferiblemente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más preferiblemente, humanos. La divulgación prevé el uso de antagonistas de activina-ActR11a (particularmente polipéptidos ActR11a solubles y anticuerpos neutralizantes dirigidos a activina o ActR11a) para el tratamiento de trastornos asociados con baja densidad ósea o disminución de la resistencia ósea.

Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control no tratada. El término "tratar" como se usa en el presente

documento incluye la profilaxis de la afección nombrada o la mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento pueden discernirse en el diagnóstico proporcionado por un médico y el resultado previsto de la administración del agente terapéutico.

5 La descripción proporciona métodos para inducir la formación de hueso y/o cartílago, evitando la pérdida ósea, aumentando la mineralización ósea o evitando la desmineralización del hueso. Por ejemplo, los antagonistas de activina-ActRIIa sujetos tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y la curación de fracturas óseas y defectos del cartílago en humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRIIa o activina pueden ser útiles en pacientes con diagnóstico de baja densidad ósea subclínica, como medida de protección contra el desarrollo de osteoporosis.

10 Las composiciones en cuestión pueden encontrar utilidad médica en la curación de fracturas óseas y defectos de cartílago en humanos y otros animales. Las composiciones en cuestión también pueden tener uso profiláctico en la reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de hueso de novo inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo u resección oncológica, y también es útil en cirugía plástica cosmética. En ciertos casos, los antagonistas de activina-ActRIIa sujetos pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Los antagonistas de activina-ActRIIa también pueden ser útiles en el tratamiento de la osteoporosis.

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

20 La osteoporosis puede ser causada por, o asociada con, varios factores. Ser mujer, particularmente una mujer posmenopáusica, tener un peso corporal bajo y llevar un estilo de vida sedentario son factores de riesgo de osteoporosis (pérdida de densidad mineral ósea, lo que conlleva un riesgo de fractura). Las personas que tengan cualquiera de los siguientes perfiles pueden ser candidatos para el tratamiento con un antagonista de ActRI: una mujer posmenopáusica y que no esté tomando estrógenos u otra terapia de reemplazo hormonal; una persona con antecedentes personales o maternos de fractura de cadera o tabaquismo; una mujer posmenopáusica que es alta (más de 5 pies y 7 pulgadas) o delgada (menos de 125 libras); un hombre con condiciones clínicas asociadas con pérdida ósea; una persona que usa medicamentos que se sabe que causan pérdida ósea, incluidos los corticosteroides como Prednisona™, varios medicamentos anticonvulsivos como Dilantin™ y ciertos barbitúricos, o medicamentos de reemplazo de tiroides en dosis altas; una persona que tiene diabetes tipo 1, enfermedad hepática, enfermedad renal o antecedentes familiares de osteoporosis; una persona que tiene un alto recambio óseo (por ejemplo, colágeno excesivo en muestras de orina); una persona con una afección tiroidea, como hipertiroidismo; una persona que ha experimentado una fractura luego de un trauma leve; una persona que ha tenido pruebas radiográficas de fractura vertebral u otros signos de osteoporosis.

35 Como se señaló anteriormente, la osteoporosis también puede resultar como una afección asociada con otro trastorno o por el uso de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante de medicamentos u otra afección médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una condición conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad excesiva de cortisol producida por el cuerpo produce osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados con la osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de medicamentos que actúan como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque se necesitan niveles adecuados de hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroides) para el desarrollo del esqueleto, el exceso de hormona tiroidea puede disminuir la masa ósea con el tiempo. Los antiácidos que contienen aluminio pueden conducir a la pérdida ósea cuando las personas con problemas renales las toman en altas dosis, particularmente las que se someten a diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbitúricos que se usan para prevenir las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un medicamento para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un medicamento utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para suprimir el sistema inmune en pacientes con trasplante de órganos; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), utilizados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (calciparina, liquaemina), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), utilizados para tratar el colesterol alto. La pérdida ósea resultante de la terapia contra el cáncer es ampliamente reconocida y se denomina pérdida ósea inducida por la terapia contra el cáncer (CTIBL). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden corregirse mediante el tratamiento con antagonistas de activina-ActRIIa.

40 Las composiciones de la invención pueden usarse en pacientes con cáncer. Los pacientes que tienen ciertos tumores (por ejemplo, mieloma múltiple) pueden ser tratados con antagonistas de activina-ActRIIa incluso en ausencia de evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas. Los pacientes también pueden ser monitorizados por evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas, y pueden ser tratados con antagonistas de activina-ActRIIa en el caso de que los indicadores sugieran un mayor riesgo. En general, las exploraciones DEXA se emplean para evaluar los cambios en la densidad ósea, mientras que los indicadores de remodelación ósea se pueden usar para evaluar la probabilidad de metástasis óseas. Se pueden controlar los marcadores séricos. La fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP) es

una enzima que está presente en los osteoblastos. Los niveles sanguíneos de BSAP aumentan en pacientes con metástasis óseas y otras afecciones que resultan en un aumento de la remodelación ósea. La osteocalcina y los péptidos de procolágeno también se asocian con la formación y metástasis óseas. Se han detectado aumentos en BSAP en pacientes con metástasis óseas causadas por cáncer de próstata y, en menor grado, en metástasis óseas por cáncer de mama. Los niveles de proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7) son altos en el cáncer de próstata que ha hecho metástasis en los huesos, pero no en metástasis óseas debido a cáncer de vejiga, piel, hígado o pulmón. El telopéptido carboxi-terminal tipo I (ICTP) es un reticulado que se encuentra en el colágeno que se forma durante la reabsorción del hueso. Dado que el hueso se descompone y reforma constantemente, ICTP se encontrará en todo el cuerpo. Sin embargo, en el sitio de metástasis óseas, el nivel será significativamente más alto que en un área de hueso normal. ICTP se ha encontrado en niveles altos en metástasis óseas debido a cáncer de próstata, pulmón y seno. Otro reticulado de colágeno, el telopéptido N-terminal tipo I (NTx), se produce junto con ICTP durante el recambio óseo. La cantidad de NTx aumenta en la metástasis ósea causada por muchos tipos diferentes de cáncer, incluido el cáncer de pulmón, próstata y mama. Además, los niveles de NTx aumentan con la progresión de la metástasis ósea. Por lo tanto, este marcador puede usarse tanto para detectar metástasis como para medir la extensión de la enfermedad. Otros marcadores de reabsorción incluyen piridinolina y desoxipiridinolina. Cualquier aumento en los marcadores de reabsorción o marcadores de metástasis óseas indica la necesidad de una terapia con antagonista de activina-ActRIIa en un paciente.

Los antagonistas de activina-ActRIIa pueden administrarse conjuntamente con otros agentes farmacéuticos. La administración conjunta se puede lograr mediante la administración de una sola formulación conjunta, mediante administración simultánea o mediante administración en momentos separados. Los antagonistas de activina-ActRIIa pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros agentes óseos activos. Un paciente puede beneficiarse de recibir conjuntamente el antagonista de activina-ActRIIa y tomar suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio apropiado y/o, en algunos casos, otros medicamentos. Ejemplos de otros medicamentos incluyen, bifosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos y raloxifeno afectan el ciclo de remodelación ósea y se clasifican como medicamentos antirresortivos. La remodelación ósea consta de dos etapas distintas: resorción ósea y formación ósea. Los medicamentos antirresortivos ralentizan o detienen la parte de reabsorción ósea del ciclo de remodelación ósea, pero no disminuyen la parte del ciclo que forma los huesos. Como resultado, la nueva formación continúa a un ritmo mayor que la resorción ósea, y la densidad ósea puede aumentar con el tiempo. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, aumenta la tasa de formación ósea en el ciclo de remodelación ósea. El alendronato está aprobado tanto para la prevención (5 mg por día o 35 mg una vez por semana) como para el tratamiento (10 mg por día o 70 mg una vez por semana) de la osteoporosis posmenopáusica. El alendronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna, muñeca y cadera. El alendronato también está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres como resultado del uso a largo plazo de estos medicamentos (es decir, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de la osteoporosis en hombres. El alendronato más vitamina D está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (70 mg una vez a la semana más vitamina D) y para el tratamiento para mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis. El ibandronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Tomado como una píldora una vez al mes (150 mg), el ibandronato se debe tomar el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. El risedronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Tomado diariamente (dosis de 5 mg) o semanalmente (dosis de 35 mg o dosis de 35 mg con calcio), el risedronato disminuye la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna y no columna. El risedronato también está aprobado para su uso por hombres y mujeres para prevenir y/o tratar la osteoporosis inducida por glucocorticoides que resulta del uso a largo plazo de estos medicamentos (es decir, prednisona o cortisona). La calcitonina es una hormona natural involucrada en la regulación del calcio y el metabolismo óseo. En mujeres que han pasado más de 5 años después de la menopausia, la calcitonina disminuye la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea de la columna y puede aliviar el dolor asociado con las fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de fracturas vertebrales. La calcitonina está disponible como inyección (50-100 UI diarias) o aerosol nasal (200 UI diarias). La terapia con estrógenos (ET)/terapia hormonal (HT) está aprobada para la prevención de la osteoporosis. Se ha demostrado que la ET reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea tanto en la columna vertebral como en la cadera, y reduce el riesgo de fracturas de cadera y columna vertebral en mujeres posmenopáusicas. La ET se administra con mayor frecuencia en forma de píldora o parche cutáneo que administra una dosis baja de aproximadamente 0.3 mg diarios o una dosis estándar de aproximadamente 0.625 mg diarios y es efectiva incluso cuando se comienza después de los 70 años. Cuando se toma estrógeno solo, puede aumentar el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer del revestimiento uterino (cáncer de endometrio). Para eliminar este riesgo, los proveedores de atención médica recetan la hormona progestina en combinación con estrógenos (terapia de reemplazo hormonal o TH) para aquellas mujeres que tienen el útero intacto. ET/HT alivia los síntomas de la menopausia y se ha demostrado que tiene un efecto beneficioso sobre la salud ósea. Los efectos secundarios pueden incluir sangrado vaginal, sensibilidad en los senos, trastornos del estado de ánimo y enfermedad de la vesícula biliar. El raloxifeno, 60 mg al día, está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Es de una clase de medicamentos llamados moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) que se han desarrollado para proporcionar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin sus posibles desventajas. El raloxifeno aumenta la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. Todavía no hay datos disponibles para demostrar que el raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras fracturas no vertebrales. La teriparatida, una

forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres y hombres posmenopáusicos con alto riesgo de fractura. Este medicamento estimula la formación de hueso nuevo y aumenta significativamente la densidad mineral ósea. En mujeres posmenopáusicas, se observó reducción de la fractura en la columna vertebral, cadera, pie, costillas y muñeca. En los hombres, se observó reducción de la fractura en la columna vertebral, pero no hubo datos suficientes para evaluar la reducción de la fractura en otros sitios. La teriparatida se autoadministra como una inyección diaria de hasta 24 meses.

7. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la invención se definen en las reivindicaciones 1-10. En ciertas realizaciones, los antagonistas de activina-ActR11a (por ejemplo, los polipéptidos ActR11a de la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a se puede administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden formularse para la administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

Las composiciones pueden administrarse sistémica o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención está en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de ActR11a que también pueden incluirse opcionalmente en la comparación como se describe anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos en cuestión (por ejemplo, polipéptidos ActR11a) en los métodos de la invención.

Típicamente, los antagonistas de ActR11a se administrarán por vía parenteral, y particularmente por vía intravenosa o subcutánea. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActR11a en combinación con una o más soluciones isotónicas acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso, que puede contener antioxidantes, reguladores, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para suministro a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActR11a) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, hueso), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser resorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActR11a. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, trifosfato de trical, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, como el hueso o el colágeno dérmico. Las matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras posibles matrices no son biodegradables y están definidas químicamente, como la hidroxiapatita sinterizada, el vidrio biológico, los aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcificosfato. La biocerámica puede ser alterada en su composición, como en el fosfato aluminato de calcio y procesada para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

Las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, saquitos, píldoras, tabletas, pastillas (usando una base aromatizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención se pueden mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3)

humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

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

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

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

Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico tratante considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la invención (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa). Los diversos factores incluyen, entre otros, la cantidad de peso óseo que se desea formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio del daño óseo, la condición del hueso dañado, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a la pérdida ósea, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz utilizada en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final, también puede afectar la dosificación. El progreso se puede monitorear mediante la evaluación periódica del crecimiento y/o reparación ósea, por ejemplo, rayos X (incluido DEXA), determinaciones histomorfométricas y etiquetado de tetraciclina.

Los experimentos con primates y humanos han demostrado que los efectos de ActRIIa-Fc en el hueso son detectables cuando el compuesto se dosifica a intervalos y cantidades suficientes para alcanzar concentraciones séricas de aproximadamente 200 ng/ml, con efectos semimáximos en biomarcadores óseos anabólicos ocurriendo a una dosis de 0.3 mg/kg o el equivalente en términos de área bajo la curva. En humanos, se pueden alcanzar niveles séricos de 200 ng/ml con una dosis única de 0.1 mg/kg o mayor y niveles séricos de 1000 ng/ml con una dosis única de 0.3 mg/kg o mayor. La vida media en suero observada de la molécula es de aproximadamente 25 a 35 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión de Fc, y por lo tanto se puede lograr un nivel de suero efectivo sostenido, por ejemplo, dosificando con aproximadamente 0.05 a 0.5 mg/kg en semanalmente o quincenalmente, o se pueden usar dosis más altas con intervalos más largos entre las dosis. Por ejemplo, dosis de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2 o 3 mg/kg, o valores intermedios, pueden usarse mensualmente o bimensualmente, y el efecto sobre el hueso puede ser lo suficientemente duradero como para que sea necesaria la dosificación solo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses. Los intervalos más largos entre las dosis están respaldados por la duración del efecto farmacodinámico, que es más largo que la duración del fármaco en el suero. Los efectos PD se observan durante al menos 120 días en pacientes humanos.

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

Diversos vectores virales que pueden utilizarse para la terapia génica como se enseña aquí incluyen adenovirus, virus del herpes, vacuna o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es

un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, entre otros: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos para el objetivo uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La orientación preferida se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicos pueden insertarse en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir la administración específica del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActR11a. En una realización preferida, el vector está dirigido a hueso o cartílago.

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

Otro sistema de suministro dirigido para polinucleótidos ActR11a es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y entregarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia eficiente de genes utilizando un vehículo de liposomas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible basándose, por ejemplo, en la especificidad de órganos, especificidad de células y especificidad de orgánulos, y es conocido en la técnica.

Ejemplificación

La invención que ahora se describe en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertas realizaciones de la presente invención, y no están destinados a limitar la invención.

Ejemplo 1: Proteínas de fusión ActR11a-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActR11a soluble que tiene el dominio extracelular de ActR11a humana fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo en el medio. Los constructos se denominan ActR11a-hFc y ActR11a-mFc, respectivamente.

ActR11a-hFc se muestra a continuación como purificado de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEV TQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Las proteínas ActR11a-hFc y ActR11a-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias guía diferentes:

(i) Mellitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

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

(iii) Nativo: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

5 La forma seleccionada emplea la guía TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK

DTLMISRTPVEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

10

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTT
TTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGT
ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
CCCCTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCATCGAGAAA
ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

15 Tanto ActR11a-hFc como ActR11a-mFc fueron notablemente susceptibles a la expresión recombinante. Como se muestra en la figura 1, la proteína se purificó como un pico de proteína único y bien definido. La secuenciación N-terminal reveló una secuencia única de -ILGRSTQE (SEQ ID NO: 11). La purificación podría lograrse mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral

e intercambio de regulador. La proteína ActR11a-hFc se purificó a una pureza de >98% según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según lo determinado por SDS PAGE.

ActR11a-hFc y ActR11a-mFc mostraron una alta afinidad por los ligandos, particularmente activina A. GDF-11 o Activina A ("ActA") se inmovilizaron en un chip Biacore CM5 usando un procedimiento de acoplamiento de amina estándar. Las proteínas ActR11a-hFc y ActR11a-mFc se cargaron en el sistema y se midió la unión. ActR11a-hFc se unió a activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{-12} , y la proteína se unió a GDF11 con un K_D de 9.96×10^{-9} . Véase Figura 2. ActR11a-mFc se comportó de manera similar.

Se usó un ensayo de gen informador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActR11a-hFc sobre la señalización por GDF-11 y Activina A. Línea celular: rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector informador: pGL3(CAGA) 12 (Descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Véase Figura 3. El motivo CAGA12 está presente en los genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), entonces este vector es de uso general para los factores de señalización a través de Smad2 y 3.

Día 1: Dividir las células A-204 en una placa de 48 pozos.

Día 2: Células A-204 transfectadas con 10 μ g de pGL3(CAGA) 12 o pGL3(CAGA) 12 (10 μ g)+ pRLCMV (1 μ g) y Fugene.

Día 3: Agregar factores (diluido en medio+ 0.1% BSA). Los inhibidores deben preincubarse con factores durante 1 hora antes de agregarlos a las células. 6 horas más tarde, las células se enjuagan con PBS y se lisan las células.

Esto es seguido por un ensayo de luciferasa. Típicamente en este ensayo, en ausencia de inhibidores, la Activina A muestra aproximadamente 10 veces la estimulación de la expresión del gen informador y una ED_{50} : ~ 2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces, ED_{50} : ~ 1.5 ng/ml. GDF-8 muestra un efecto similar a GDF-11.

Como se muestra en la Figura 4, ActR11a-hFc y ActR11a-mFc inhiben la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares. Como se muestra en la Figura 5, tres preparaciones diferentes de ActR11a-hFc inhibieron la señalización de GDF-11 con una IC_{50} de aproximadamente 200 pM.

El ActR11a-hFc fue muy estable en estudios farmacocinéticos. Las ratas se dosificaron con 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActR11a-hFc y los niveles plasmáticos de la proteína se midieron a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio separado, las ratas se dosificaron a 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En ratas, ActR11a-hFc tuvo una vida media en suero de 11-14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron bastante altos después de dos semanas (11 μ g/ml, 110 μ g/ml o 304 μ g/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.) En los monos cynomolgus, la vida media plasmática fue sustancialmente mayor de 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron de 25 μ g/ml, 304 μ g/ml o 1440 μ g/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente. Los resultados preliminares en humanos sugieren que la vida media en suero es de aproximadamente 20 a 30 días.

Ejemplo 2: ActR11a-mFc promueve el crecimiento óseo in vivo

Se administró a ratones hembra normales (BALB/c) ActR11a-mFc a un nivel de 1 mg/kg/ dosis, 3 mg/kg/dosis o 10 mg/kg/dosis, con dosis administradas dos veces por semana. La densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo se determinaron mediante DEXA, Véase Figura 6.

En ratones hembra BALB/c, las exploraciones DEXA mostraron un aumento significativo (>20%) en la densidad mineral y el contenido óseo como resultado del tratamiento con ActR11a-mFc. Véase Figuras 7 y 8.

Por lo tanto, el antagonismo de ActR11a provocó un aumento de la densidad ósea y el contenido en ratones hembra normales. Como siguiente paso, se probó el efecto de ActR11a-mFc sobre el hueso en un modelo de ratón para la osteoporosis.

Andersson et al. (2001), establecieron que los ratones ovariectomizados sufrieron una pérdida ósea sustancial (pérdida del 50% del hueso trabecular seis semanas después de la operación), y que la pérdida ósea en estos ratones podría corregirse con agentes terapéuticos candidatos, como la hormona paratiroidea.

Los solicitantes usaron ratones hembra C57BL6 que fueron ovariectomizados (OVX) u operados simulados a las 4-5 semanas de edad. Ocho semanas después de la cirugía, se inició el tratamiento con ActR11a-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) o control (PBS). La densidad ósea se midió por escáner CT.

Como se muestra en la figura 9, los ratones ovariectomizados no tratados mostraron una pérdida sustancial de densidad ósea trabecular con respecto a los controles simulados después de seis semanas. El tratamiento con ActR11a-mFc restauró la densidad ósea al nivel de los ratones operados simulados. A las 6 y 12 semanas de tratamiento, ActR11a-mFc causó un aumento sustancial en el hueso trabecular de los ratones OVX. Véase Figura 10.

Después de 6 semanas de tratamiento, la densidad ósea aumentó en un 24% con respecto a los controles de PBS. Después de 12 semanas, el aumento fue del 27%.

5 En los ratones operados simulados, ActR11a-mFc también causó un aumento sustancial en el hueso trabecular. Véase Figura 11. Después de 6 y 12 semanas, el tratamiento produjo un aumento del 35% en relación con los controles.

10 En un conjunto adicional de experimentos, los ratones ovariectomizados (OVX) u operados simulados como se describió anteriormente se trataron con ActR11a-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) o control (PBS) durante doce semanas. Similar a los resultados descritos anteriormente para ActR11a-mFc, los ratones OVX que recibieron ActR11a-mFc mostraron un aumento en la densidad ósea trabecular del 15% a las cuatro semanas y del 25% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 12). Los ratones operados simulados que recibieron ActR11a-mFc mostraron de manera similar un aumento en la densidad ósea trabecular del 22% a las cuatro semanas y del 32% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 13).

15 Después de doce semanas de tratamiento con ActR11a-mFc, el análisis DEXA de fémur de cuerpo entero y ex vivo mostró que el tratamiento induce un aumento en la densidad ósea tanto en ratones ovariectomizados como operados simulados (Figuras 14A y 14B, respectivamente). Estos resultados también están respaldados por el análisis ex vivo de pQCT del eje medio femoral que demostró un aumento significativo en la densidad ósea total y cortical después de doce semanas de tratamiento con ActR11a-mFc. Los ratones ovariectomizados de control tratados con vehículo exhibieron densidades óseas que eran comparables a los ratones operados con control simulado tratados con vehículo (Figura 15). Además de la densidad ósea, el contenido óseo aumentó después del tratamiento con ActR11a-mFc. El análisis ex vivo de pQCT del eje medio femoral demostró un aumento significativo en el contenido óseo total y cortical después de doce semanas de tratamiento con ActR11a-mFc, mientras que tanto los ratones tratados con control de vehículos ovariectomizados como los de control simulado mostraron un contenido óseo comparable (Figura 16). El análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral también mostró que los ratones tratados con ActR11a-mFc no mostraron un cambio en la circunferencia perióstica; sin embargo, el tratamiento con ActR11a-mFc resultó en una disminución en la circunferencia endosteal que indica un aumento en el grosor cortical debido al crecimiento en la superficie interna del fémur (Figura 17).

20 Pruebas mecánicas de fémures determinaron que ActR11a-mFc podía aumentar las características extrínsecas del hueso (carga máxima, rigidez y energía para romperse), lo que contribuyó a un aumento significativo de las propiedades intrínsecas (resistencia final) de los huesos. Los ratones ovariectomizados tratados con ActR11a-mFc exhibieron un aumento de la resistencia ósea a niveles más allá de los controles operados simulados, tratados con vehículo, lo que indica una reversión completa del fenotipo osteoporótico (Figura 18).

25 Estos datos demuestran que un antagonista de activina-ActR11a puede aumentar la densidad ósea en ratones hembras normales y, además, corregir defectos en la densidad ósea, el contenido óseo y, en última instancia, la resistencia ósea, en un modelo de osteoporosis en ratones.

30 En un conjunto adicional de experimentos, los ratones fueron ovariectomizados u operados de manera simulada a las 4 semanas, y comenzando a las 12 semanas recibieron placebo o ActR11a-mFc (2 veces/semana, 10 mg/kg) (también denominado RAP-11 en las Figuras 19-24), por un período adicional de 12 semanas. Se evaluaron una variedad de parámetros óseos. Como se muestra en la Figura 19, ActR11a-mFc aumentó las proporciones de volumen vertebral trabecular óseo a volumen total (BV/TV) en los ratones operados con OVX y SHAM. ActR11a-mFc también mejoró la arquitectura trabecular (Figura 20), aumentó el grosor cortical (Figura 21) y mejoró la resistencia ósea (Figura 22). Como se muestra en la Figura 23, ActR11a-mFc produjo efectos deseables en un rango de dosis de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

35 La histomorfometría ósea se realizó en un punto temporal de 2 semanas en ratones operados simulados. Estos datos, presentados en la Figura 24, demuestran que ActR11a-mFc tiene un doble efecto, inhibiendo la resorción ósea y promoviendo el crecimiento óseo. Por lo tanto, ActR11a-mFc estimula el crecimiento óseo (efecto anabólico) e inhibe la resorción ósea (efecto anticatabólico). BV = volumen óseo; TV = volumen total de tejido. BV/TV es una medida del porcentaje de volumen óseo que se mineraliza. ES = superficie erosionada; BS = superficie ósea. ES/BS es una medida de la erosión ósea, y la disminución causada por RAP-011 demuestra un efecto antirresortivo o anticatabólico. Ms/Bs es la relación de superficie mineralizante/superficie ósea, que es un indicador del crecimiento óseo o efecto anabólico. De manera similar, la tasa de aposición mineral (MAR) y la tasa de formación ósea por superficie ósea por día (BFR/BSd) indican crecimiento óseo. Se toman medidas de osteoblastos (Nob/BPm) y osteoclastos (Noc/BPm) para probar el mecanismo de acción.

40 Se realizó un segundo experimento de histomorfometría ósea en ratones hembra C57BL/6, comenzando a la edad de doce semanas. Los ratones se dosificaron por vía intraperitoneal dos veces por semana con 10 mg/kg de ActR11a-mFc durante dos semanas, cuatro semanas, ocho semanas o doce semanas. Cada grupo se sacrificó cinco días después de la última dosis y se tomaron huesos para su análisis. Los ratones fueron etiquetados con calceína nueve días y dos días antes de la eutanasia. Como se muestra en la Figura 25, las métricas muestran que ActR11a-mFc promueve el crecimiento óseo y la mineralización y tiene efectos tanto anabólicos como anticatabólicos. Véase, por ejemplo, la

relación BV/TV, la relación ES/BS y la relación MS/BS. Los efectos anabólicos parecen persistir durante todo el régimen de dosificación, mientras que los efectos antirresortivos parecen tener una vida más corta en los ratones.

Ejemplo 3: ActR11a-mFc mejora o previene el daño óseo en un modelo murino de mieloma múltiple

Los pacientes con mieloma múltiple exhiben un trastorno de pérdida ósea caracterizado por una mayor actividad de osteoclastos y una menor formación de hueso por los osteoblastos. El modelo de mieloma 5T2MM en ratones se basa en el uso de células tumorales (células 5T2MM) de un tipo de tumor espontáneo que se desarrolla en ratones de edad avanzada y causa efectos en ratones que son similares a los observados en pacientes con mieloma múltiple humano. Véase, por ejemplo, Vanderkerken et al., *Methods Mol Med.* 2005; 113: 191-205. ActR11a-mFc fue probada para efectos en este modelo.

Las células 5T2MM inyectadas en ratones C57Bl/KaLwRij promovieron un aumento en la superficie de los osteoclastos, la formación de lesiones osteolíticas y causaron una disminución en el área ósea. La enfermedad ósea se asoció con una disminución en el número de osteoblastos, la superficie de los osteoblastos y una reducción en la mineralización.

Los ratones que portaban células 5T2MM se trataron con ActR11a-mFc (RAP-011) (10 mg/kg, i.p. dos veces por 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 del 39% y 21% en el volumen del hueso esponjoso ($p < 0.001$ y $p < 0.01$) y una reducción del 37% y 15% en el número trabecular ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) en ratones con 5T2MM en comparación con ratones ingenuos. RAP-011 evitó por completo las disminuciones inducidas por 5T2MM en el volumen y el número trabecular tanto en tibia ($p < 0.001$ y $p < 0.05$) como en vértebras ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) en comparación con los ratones tratados con vehículo. El volumen óseo fue 19% más alto en la tibia ($p = 168$) y 12% más alto en las vértebras ($p < 0.05$) de los ratones tratados con RAP-011 en comparación con los ratones ingenuos. RAP-011 previno el desarrollo de lesiones óseas osteolíticas ($p < 0.05$). Este efecto se ilustra en la Figura 26. Si bien una evaluación preliminar de los datos no logró identificar efectos significativos sobre la paraproteína sérica (un biomarcador de células tumorales de mieloma múltiple) o la carga de mieloma en este estudio, un análisis adicional indicó que la paraproteína sérica disminuyó sustancialmente en todos menos uno de los animales tratados, y además que el volumen de médula ósea sana se incrementó sustancialmente, lo que indica una disminución en la carga de células tumorales de mieloma.

Por lo tanto, ActR11a-mFc puede usarse para disminuir los efectos de la enfermedad ósea resultante del mieloma múltiple y para tratar las propias células tumorales.

Ejemplo 4: Caracterización de una proteína ActR11a-hFc

La proteína de fusión ActR11a-hFc se expresó en células CHO-DUKX B11 transfectadas de manera estable a partir de un vector pAID4 (SV40 ori/potenciador, promotor CMV), usando una secuencia guía de plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 9. La proteína, purificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, tenía una secuencia de SEQ ID NO: 7. La porción Fc es una secuencia Fc de IgG1 humana, como se muestra en la SEQ ID NO: 7. El análisis del ácido siálico mostró que la proteína contenía, en promedio, entre aproximadamente 1.5 y 2.5 mol de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActR11a-hFc.

Esta proteína purificada mostró una semivida en suero notablemente larga en todos los animales probados, incluida una semivida de 25-32 días en pacientes humanos (véase el Ejemplo 5, más adelante). Además, el material expresado en células CHO tiene una mayor afinidad por el ligando de activina B que la informada por una proteína de fusión ActR11a-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., *J Biol Chem.* 2004 Dec 17; 279(51): 53126-35.) Además, el uso de la secuencia guía tPa proporcionó una mayor producción que otras secuencias guía y, a diferencia de ActR11a-Fc expresado con una guía nativa, proporcionó una secuencia N-terminal altamente pura. El uso de la secuencia guía nativa dio como resultado dos especies principales de ActR11a-Fc, cada una con una secuencia N-terminal diferente.

Ejemplo 5: Ensayo clínico humano

La proteína descrita en el Ejemplo 4 se administró a pacientes humanos en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo que se realizó para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres sanas posmenopáusicas. Cuarenta y ocho sujetos fueron asignados al azar en cohortes de 6 para recibir una dosis única de ActR11a-hFc o placebo (5 activos: 1 placebo). Los niveles de dosis variaron de 0.01 a 3.0 mg/kg por vía intravenosa (IV) y de 0.03 a 0.1 mg/kg por vía subcutánea (SC). Todos los sujetos fueron seguidos durante 120 días. Los sujetos fueron excluidos de la participación en el estudio si tomaron medicamentos que afectan el metabolismo óseo dentro de los 6 meses posteriores al ingreso al estudio. Se realizaron evaluaciones de seguridad después de cada cohorte para determinar el aumento de la dosis. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), la actividad biológica de ActR11a-hFc también se evaluó mediante la medición de marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea, y los niveles de FSH.

No se informaron eventos adversos graves en este estudio. Los eventos adversos (EA) fueron generalmente leves y transitorios. El análisis preliminar de los AA incluyó dolor de cabeza, valores elevados de laboratorio, síntomas de resfriado, emesis o vómitos, infiltración intravenosa y hematoma en el sitio de inyección.

5 El análisis PK de ActR11a-hFc mostró un perfil lineal con la dosis, y una vida media de aproximadamente 25-32 días. El área bajo la curva (AUC) para ActR11a-hFc se relacionó linealmente con la dosis, y la absorción después de la administración de SC fue esencialmente completa (Véase Figuras 27 y 28). Estos datos indican que la SC es un enfoque deseable para la dosificación porque proporciona una biodisponibilidad equivalente y una vida media en suero para el fármaco, al tiempo que evita el aumento en las concentraciones séricas del fármaco asociado con los primeros días de dosificación IV (Véase Figura 28). ActR11a-hFc causó un aumento rápido y sostenido dependiente de la dosis en los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica para hueso (BAP), que es un marcador para el crecimiento óseo anabólico, y una disminución dependiente de la dosis en el telopéptido y tartrato de colágeno tipo 1 C-terminal resistente a los niveles de fosfatasa ácida 5b, que son marcadores para la resorción ósea. Otros marcadores, como P1NP, mostraron resultados no concluyentes. Los niveles de BAP mostraron efectos casi saturantes en la dosis más alta del fármaco, lo que indica que los efectos semimáximos en este biomarcador óseo anabólico podrían lograrse a una dosis de 0.3 mg/kg, con incrementos que varían hasta 3 mg/kg. Calculado como una relación del efecto farmacodinámico con el AUC para el fármaco, la EC_{50} es 51.465 (día*ng/ml). Véase Figura 29. Estos cambios de biomarcadores óseos se mantuvieron durante aproximadamente 120 días a los niveles de dosis más altos probados. También hubo una disminución dependiente de la dosis en los niveles séricos de FSH consistente con la inhibición de activina.

Una dosis única de ActR11a-hFc administrada a mujeres posmenopáusicas sanas fue segura y bien tolerada para el rango de niveles de dosis probados. La PK prolongada y los efectos farmacodinámicos sugieren que la dosificación intermitente sería apropiada para futuros estudios. Por ejemplo, la dosificación en función de la semivida en suero podría realizarse mensualmente o en el orden de una vez cada dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas. Además, debido a que el efecto farmacodinámico se extiende mucho más allá de la residencia sérica del medicamento, la dosificación podría realizarse sobre la base del efecto farmacodinámico, lo que significa que la dosificación cada tres meses o cada dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso doce meses puede ser efectivo para producir el efecto deseado en pacientes. Este ensayo clínico demuestra que, en humanos, ActR11a-hFc es un agente osteoanabólico con evidencia biológica de un aumento en la formación de hueso y una disminución en la resorción ósea.

Ejemplo 6: Administración conjunta de ActR11a-mFc y un bisfosfonato

Los bisfosfonatos son una clase de fármacos que se usan ampliamente para tratar trastornos asociados con baja densidad mineral ósea, que incluyen osteoporosis y pérdida ósea relacionada con cáncer. Los bisfosfonatos tienen una potente actividad antirresortiva, inhibiendo los osteoclastos. Quizás debido a que los osteoclastos son necesarios tanto para la descomposición ósea como para el crecimiento óseo, los bisfosfonatos parecen disminuir los efectos de la hormona paratiroidea (PTH), uno de los únicos agentes anabólicos conocidos para el crecimiento óseo (Black et al., N Engl J Med. 2003, 25 de septiembre; 349(13): 1207-15; Samadfam et al., Endocrinology.2007 Jun; 148(6): 2778-87).

Para evaluar la utilidad del tratamiento con ActR11a-Fc en pacientes que habían recibido previamente o concomitantemente bisfosfonato u otra terapia antirresortiva, los ratones se probaron con ActR11a-mFc y zoledronato combinados, un compuesto de bisfosfonato. Los ratones C57BL/6N de 12 semanas de edad se trataron de la siguiente manera:

Grupo 1 PBS

Grupo 2 ActR11a-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) dos veces por semana (con los grupos 3 y 4)

Grupo 3 Dosis de ácido zoledrónico (ZOL) (20 mg/kg)

Grupo 4 ZOL (1 dosis), 3 días después ActR11a-mFc (RAP-011) (1 mg/kg) dos veces por semana

Grupo 5 ZOL (1 dosis), 3 días después ActR11a-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) dos veces por semana

La BDM total se determinó mediante exploración DEXA (PIXI) antes de la dosificación y a las 3 y 8 semanas de tratamiento.

Como se muestra en la Figura 30, la BDM total aumentó notablemente en todos los grupos de tratamiento, con la combinación de ZOL y ActR11a-mFc produciendo los mayores efectos. Estos resultados indican que las proteínas ActR11a-Fc pueden usarse para aumentar la densidad ósea, incluso en pacientes que han recibido terapia con bisfosfonatos.

Ejemplo 7: ActR11a-Fc mejora o previene la pérdida ósea causada por metástasis de cáncer de seno

Se estima que del 65 al 75 por ciento de los cánceres de seno hacen metástasis en los huesos, causando daños sustanciales a la estructura ósea, aumentando el riesgo de fracturas y causando dolor y otros efectos secundarios. Probamos los efectos de ActRIIa-Fc en un modelo de ratón de cáncer de mama que ha hecho metástasis en los huesos.

5 Una sublínea de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (clon 2287) se cultivó in vitro y las células se cosecharon a una densidad de 5×10^6 células/ml. MDA-MB-231 es una línea celular que es altamente competente para sembrar hueso y causar daño óseo similar al causado por metástasis óseas. Se inyectaron 10 ml de células en la tibia de ratones desnudos atímicos hembra de 6 semanas de edad en el día de estudio 0. En el día de estudio 10 ratones recibieron ActRIIa-mFc (10 mg/kg/dos veces por semana/subcutáneo) (n=8) o vehículo PBS (n=7) La progresión de la enfermedad se evaluó mediante absorciometría de rayos X de energía dual (PIXIMus) a intervalos semanales. Los ratones se trataron con ActRIIa-mFc durante 4 semanas y luego se sacrificaron y se recogieron tibias (tanto tumor inyectado como no quitado) de cada animal. Las tibias fueron procesadas y preparadas para microCT y análisis histológico.

15 La inyección intratibial de células MDA-MB-231 en ratones atímicos desnudos promovió el desarrollo de lesiones óseas osteolíticas en la tibia inyectada en comparación con la pierna contralateral. El análisis de MicroCT de la tibia proximal demostró una reducción del 62% en el volumen de hueso esponjoso en las tibias portadoras de MDA-MB-231 en comparación con la tibia no apareada en ratones tratados con vehículo PBS. El tratamiento con ActRIIa-mFc condujo a un aumento del 70% o 147% en la tibia ingenua o tumoral, respectivamente, en comparación con el vehículo ($P < 0.01$ para ambos). Las tibias portadoras de tumor de los ratones tratados con ActRIIa-mFc tenían una densidad ósea esponjosa similar a la de las tibias ingenuas de los ratones tratados con VEH ($p=0.39$).

20 Por lo tanto, ActRIIa-mFc es capaz de eliminar el daño óseo asociado con la presencia de células tumorales de mama en el hueso.

25 Ejemplo 8: Proteínas alternativas ActRIIa-Fc

30 Una construcción alternativa puede tener una eliminación de la cola C-terminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRIIa. La secuencia para tal construcción se presenta a continuación (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVLEFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPPVLDSDG
SFEFLYSKLTVDKSRWQOGN VFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 Listado de secuencias

<110> KNOPF, JOHN KUMAR, RAVINDRA SEEHRA, JASBIR

40 <120> ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRIIA Y USOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO DE LOS HUESOS EN PACIENTES CON CÁNCER

<130> P48008EP1/NJL

<140> EP 11195151.3

45 <141> 2008-02-01

<150> US 60/900,580

50 <151> 2007-02-09

<150> US 60/932,762

<151> 2007-05-31

55 <150> US 60/937,365

<151> 2007-06-26
5 <150> US 61/000,528
<151> 2007-10-25
<160> 18
10 <170> Patente Ver. 3.3
<210> 1
<211> 513
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 1

ES 2 756 725 T3

Met	Gly	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Phe	Ala	Val	Phe	Leu	Ile	Ser	Cys
1				5					10					15	
Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Leu	Gly	Arg	Ser	Glu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Phe
			20					25					30		
Phe	Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Lys	Asp	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Val	Glu
		35					40					45			
Pro	Cys	Tyr	Gly	Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	His	Cys	Phe	Ala	Thr	Trp
	50					55					60				
Lys	Asn	Ile	Ser	Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Leu
65					70					75					80
Asp	Asp	Ile	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Val	Glu	Lys	Lys	Asp
				85					90					95	
Ser	Pro	Glu	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Met	Cys	Asn	Glu
			100						105					110	
Lys	Phe	Ser	Tyr	Phe	Pro	Glu	Met	Glu	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Asn
		115					120						125		
Pro	Val	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Ile	Leu	Leu	Tyr	Ser	Leu
	130						135					140			
Val	Pro	Leu	Met	Leu	Ile	Ala	Gly	Ile	Val	Ile	Cys	Ala	Phe	Trp	Val

ES 2 756 725 T3

Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
 500 505 510

Leu

<210> 2

5 <211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 2

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro
 115

15 <210> 3

<211> 100

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 756 725 T3

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met
 100

<210> 4

5 <211> 1542

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

```

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60
atacttggta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggctg 240
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300
tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360
gaagtccacac agcccacttc aaatccagtt acacctaacg caccctatta caacatcctg 420
ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480
tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540
ccccacactt ctccattact agggttgaaa ccactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
tttccaatac aggacaaaca gtcattggca aatgaatacg aagtctacag ttgacctgga 720
atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840
gctaattgtg tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaacctggc tagaggattg 900
gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020
tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataccca tggacagggt 1080
ggtaccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140
gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtc tatgggaact ggcttctcgc 1200
tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatggtgc cattedgag gaaattggc 1260
cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctggt 1320
ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
tgttgggatc acgacgcaga agccaggta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542
  
```

15 <210> 5

<211> 345

<212> ADN

ES 2 756 725 T3

<213> Homo sapiens

<400> 5

5

```
atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaaacaagg ttgttggctg 180
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
gaagtccacac agcccacttc aatccagtt acacctaagc caccc 345
```

<210> 6

10

<211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo sintético

20

<220>

<221> MOD_RES

25

<222> (43)

<223> Asp o Ala

<220>

30

<221> MOD_RES

<222> (100)

35

<223> Lys o Ala

<220>

<221> MOD_RES

40

<222> (212)

<223> Asn o Ala

45

<400> 6

ES 2 756 725 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220
 Lys
 225

<210> 7

5 <211> 344

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

15 <400> 7

ES 2 756 725 T3

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 8

5 <211> 21

ES 2 756 725 T3

<212> PRT

<213> Apis mellifera

5 <400> 8

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

10 <210> 9

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Organismo desconocido

<220>

20 <223> Descripción del organismo desconocido: Activador del plasminógeno tisular

<400> 9

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
 20

25 <210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

<220>

35 <223> Descripción del organismo desconocido: Péptido nativo

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala
 20

40 <210> 11

<211> 8

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 11

ES 2 756 725 T3

Ile Leu Gly Arg Ser Thr Gln Glu
1 5

5 <210> 12

<211> 329

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 12

ES 2 756 725 T3

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<211> 369

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 13

ES 2 756 725 T3

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr
 20 25 30

Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn
 35 40 45

Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His
 50 55 60

Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys
 65 70 75 80

Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys
 85 90 95

Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110

Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr
 115 120 125

Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly
 130 135 140

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 145 150 155 160

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 165 170 175

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 180 185 190

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 195 200 205

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 210 215 220

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 225 230 235 240

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 245 250 255

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

ES 2 756 725 T3

	260		265		270														
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr			
			275					280					285						
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu			
		290					295					300							
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu			
	305					310					315					320			
	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys			
					325					330					335				
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu			
				340					345					350					
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
			355					360					365						

Lys

<210> 14

5 <211> 1114

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

15

<400> 14

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtggtgaacc gtggtatggt gacaaagata 180
aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatacca gttacaccta agccaccac 420
cgggtggtgga actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt 540
cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctccaaagc 780
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840
caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatagaga attc 1114

```

<210> 15

20

<211> 108

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActRIIa-Fc, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc es un dímero formado por dos polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 fusionada a Fc, y en donde el dímero tiene tres o más unidades estructurales de ácido siálico.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se une a activina y/o GDF11.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se une a la activina.
- 15 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se une a la activina A.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se une a la activina B.
- 20 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se une a GDF11.
7. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición farmacéutica es adecuada para administración subcutánea.
- 25 8. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se expresa a partir de una célula CHO.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc se expresa a partir de la célula CHO usando una secuencia guía del activador de plasminógeno tisular (TPA).
- 30 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde la guía TPA consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

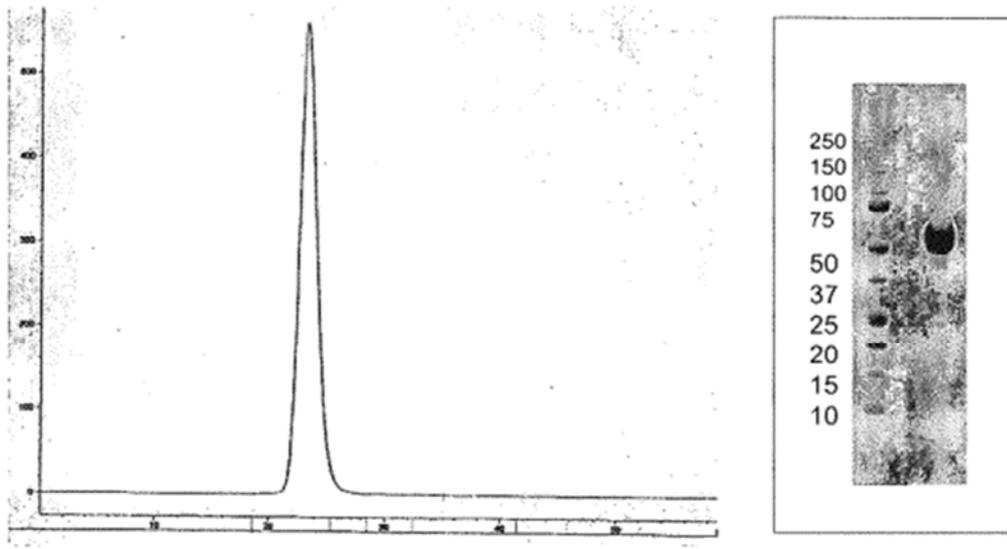


Figura 1

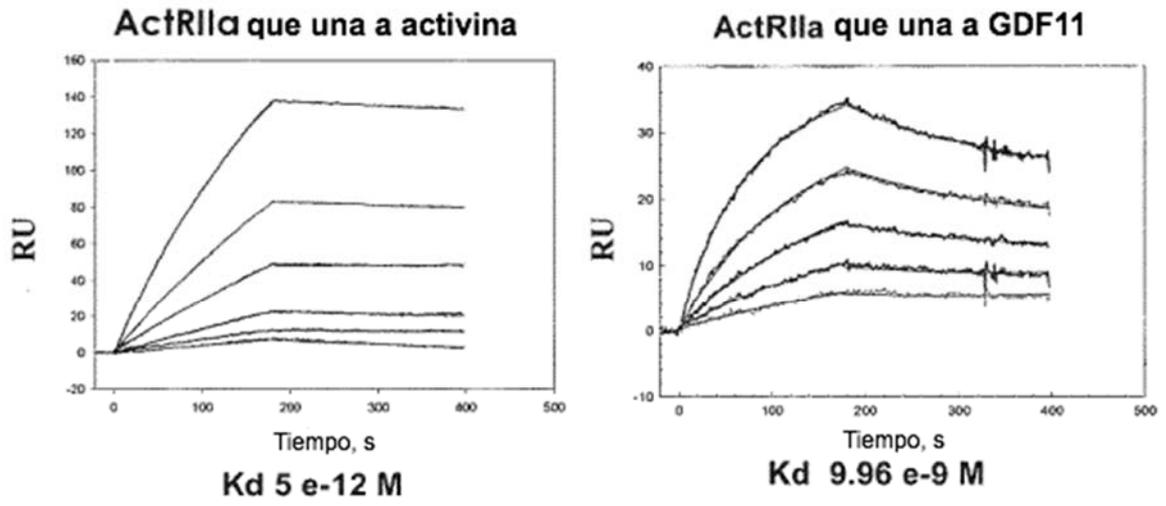


Figura 2

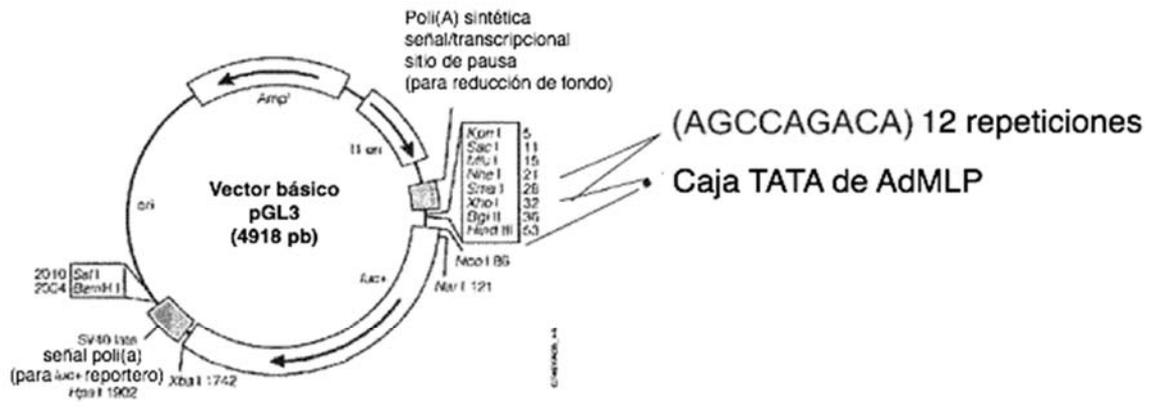


Figura 3

Inhibición de GDF-8 por ActRIIa (Células A204)

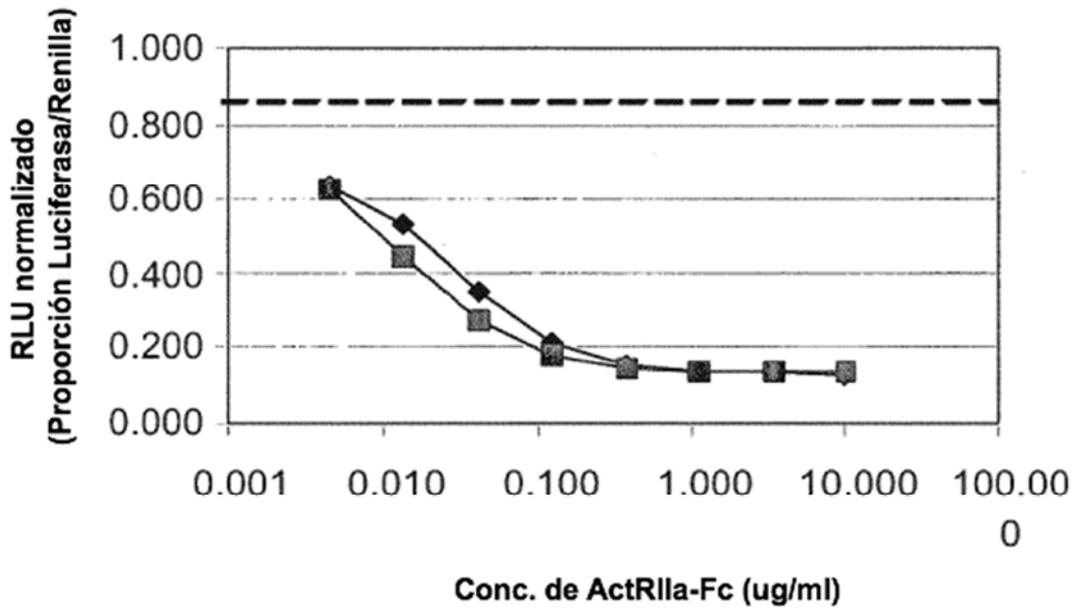


Figura 4

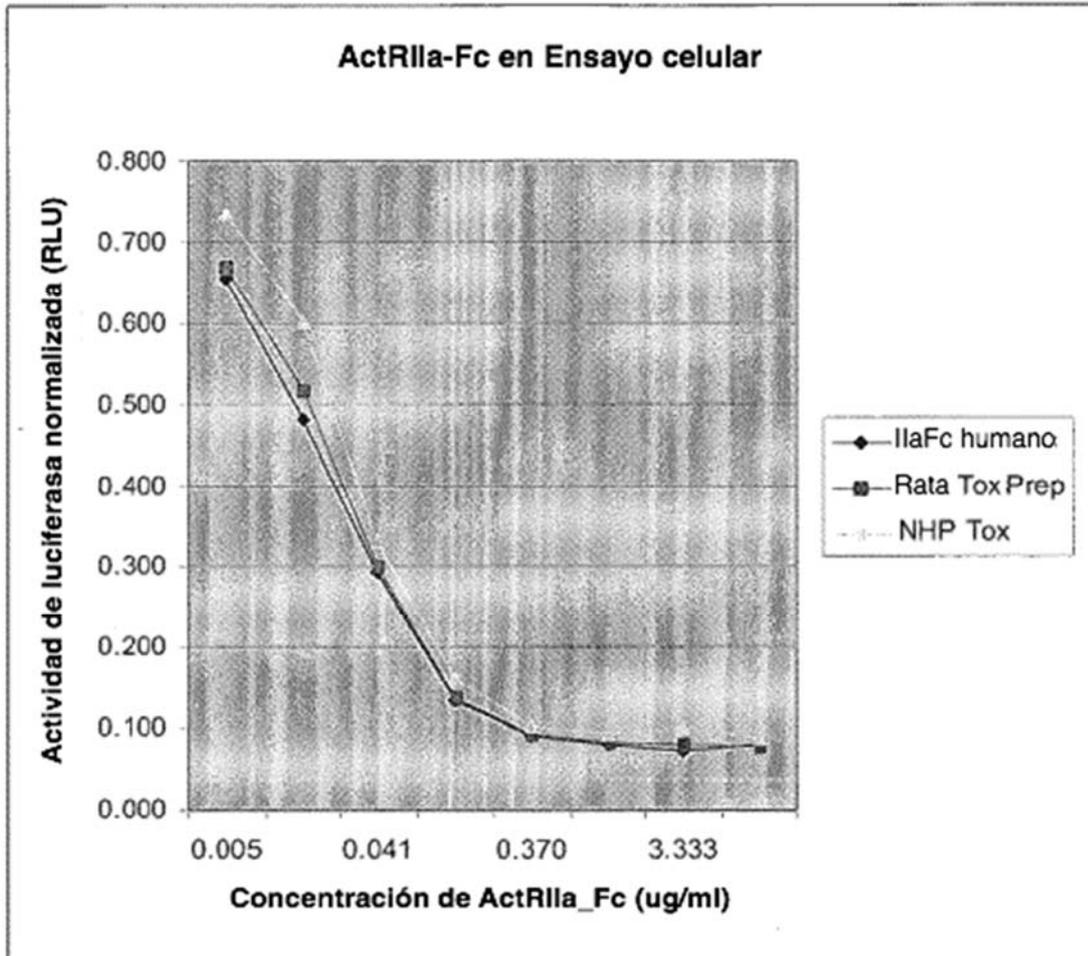


Figura 5

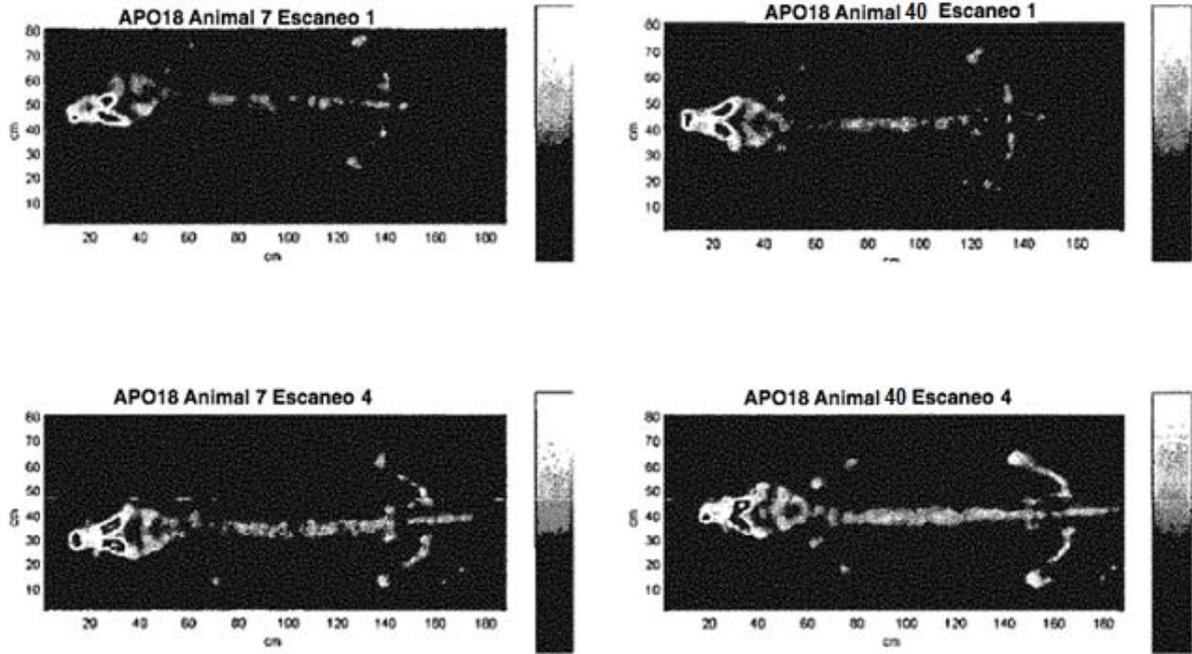


Figura 6

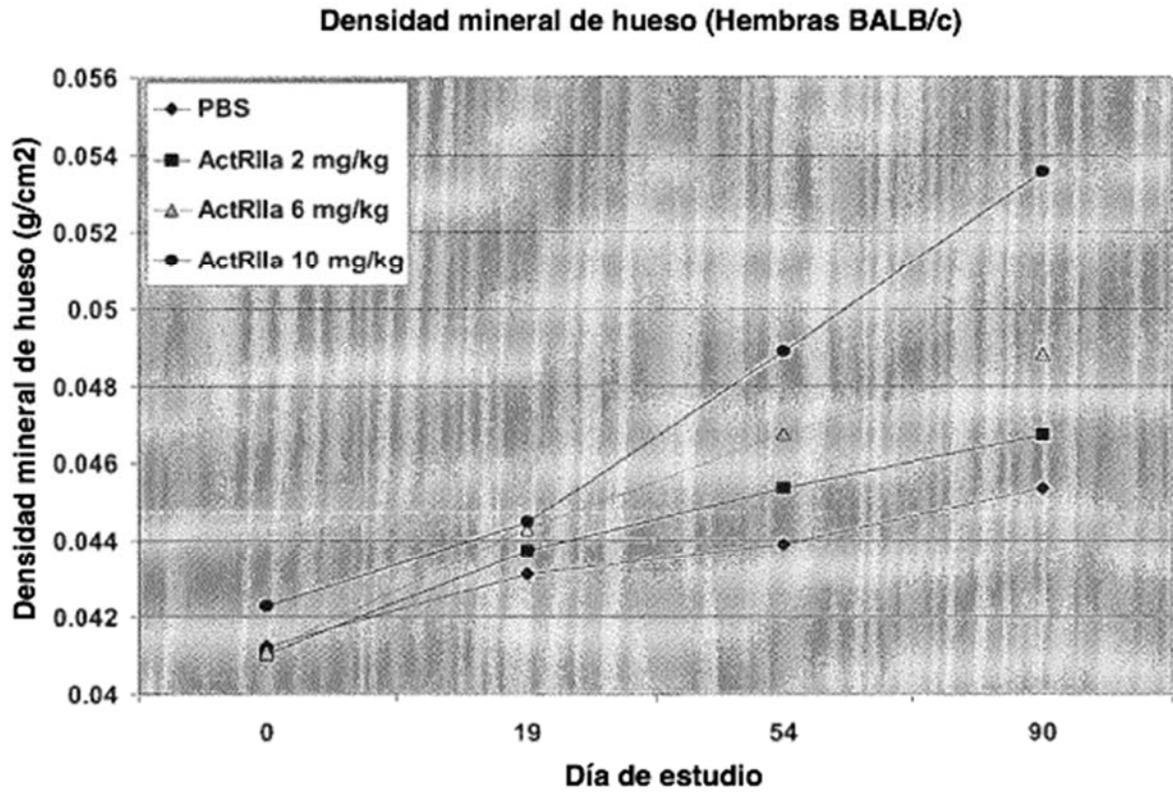


Figura 7

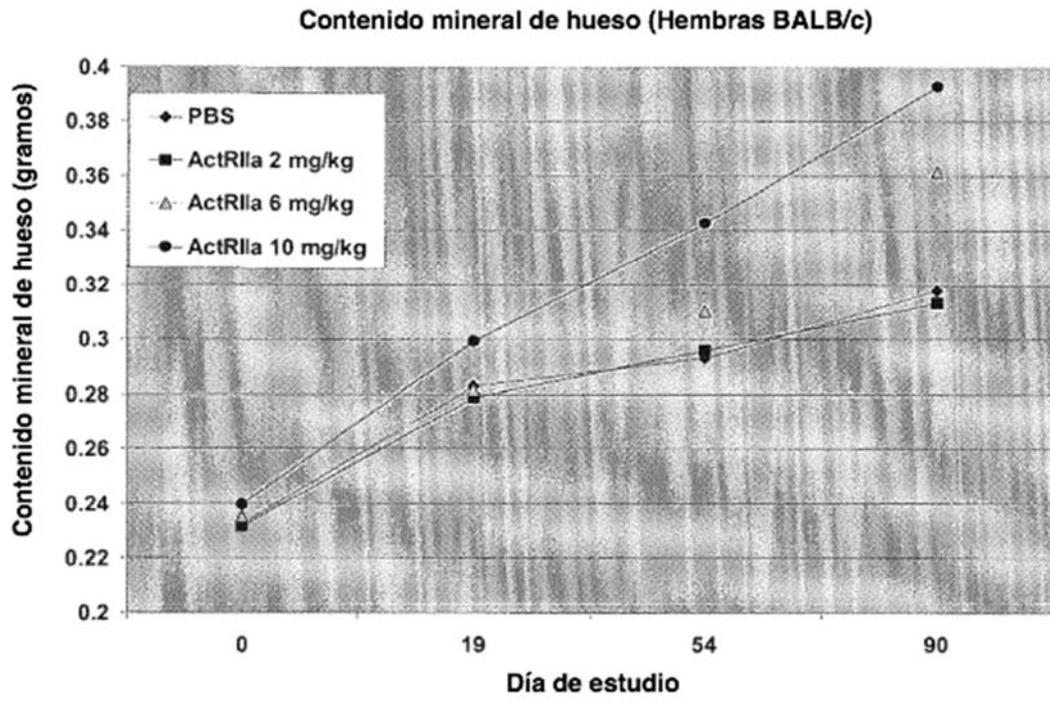


Figura 8

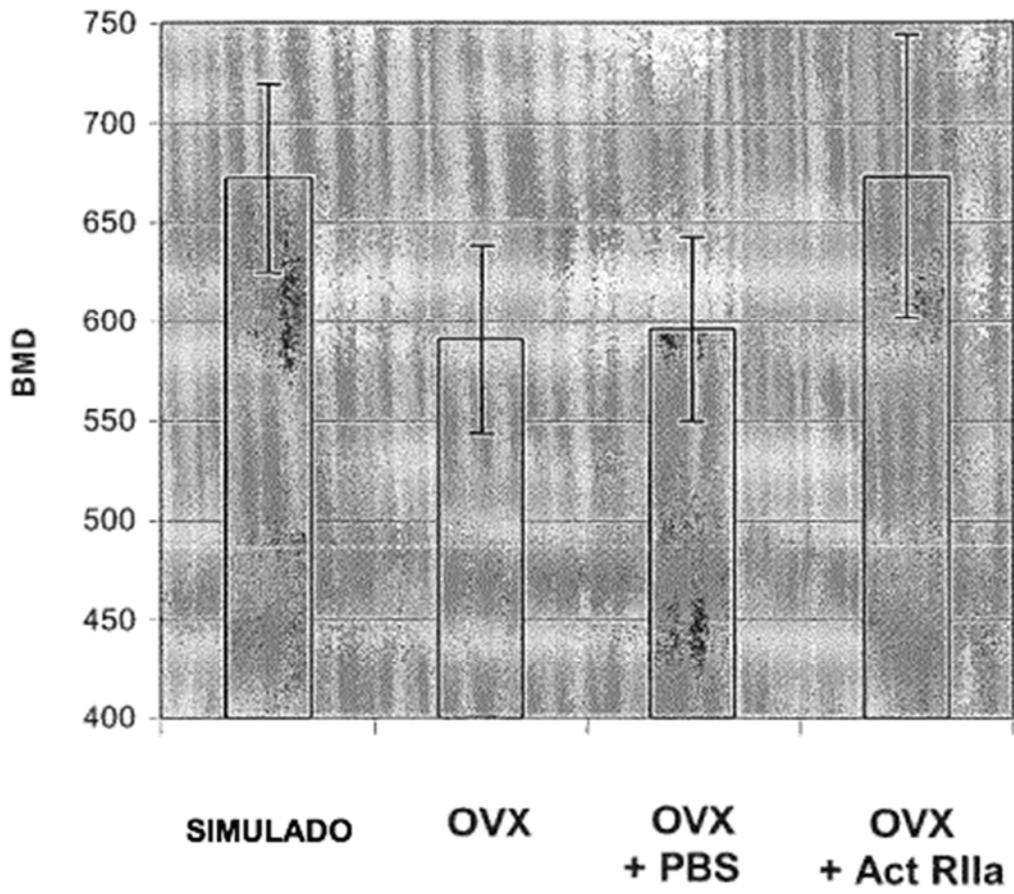


Figura 9

Hueso trabecular (C57BL/6 ovariectomizadas)

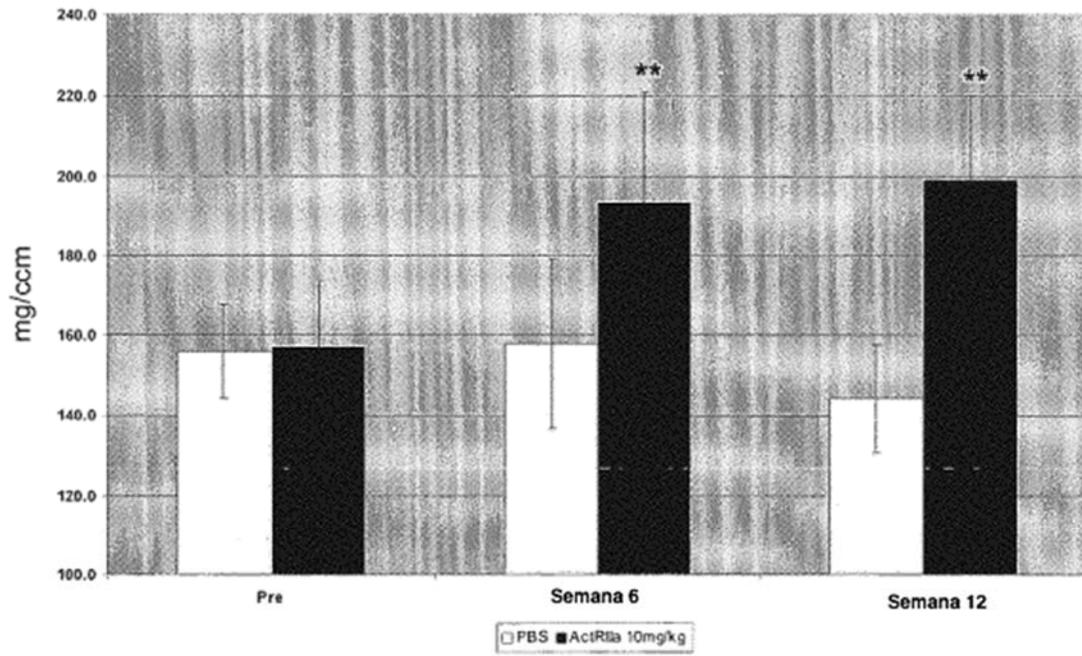


Figura 10

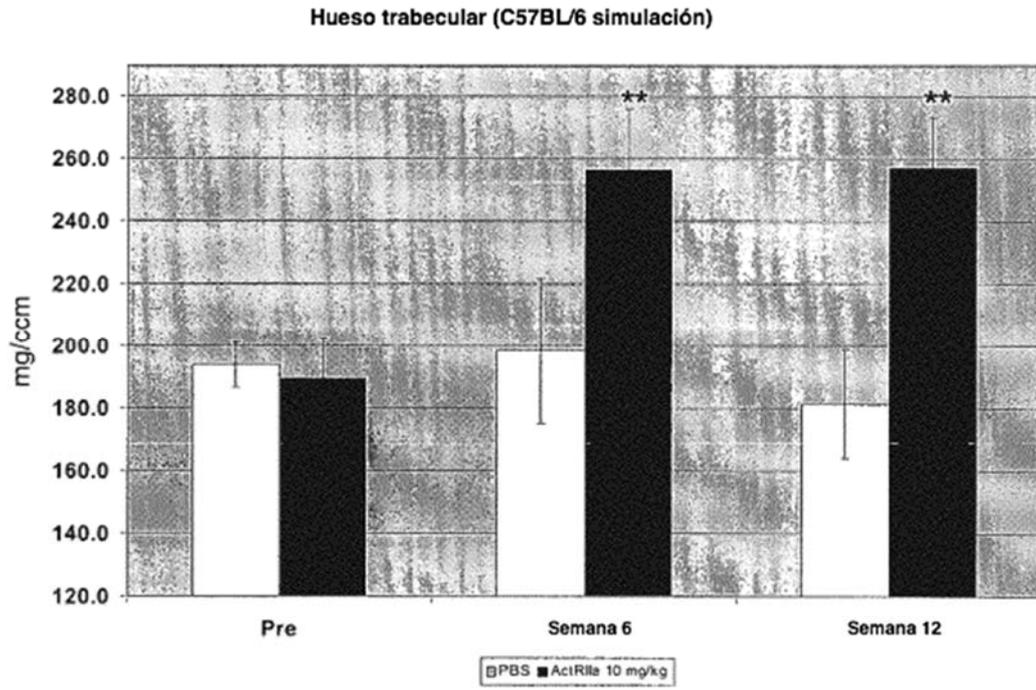


Figura 11

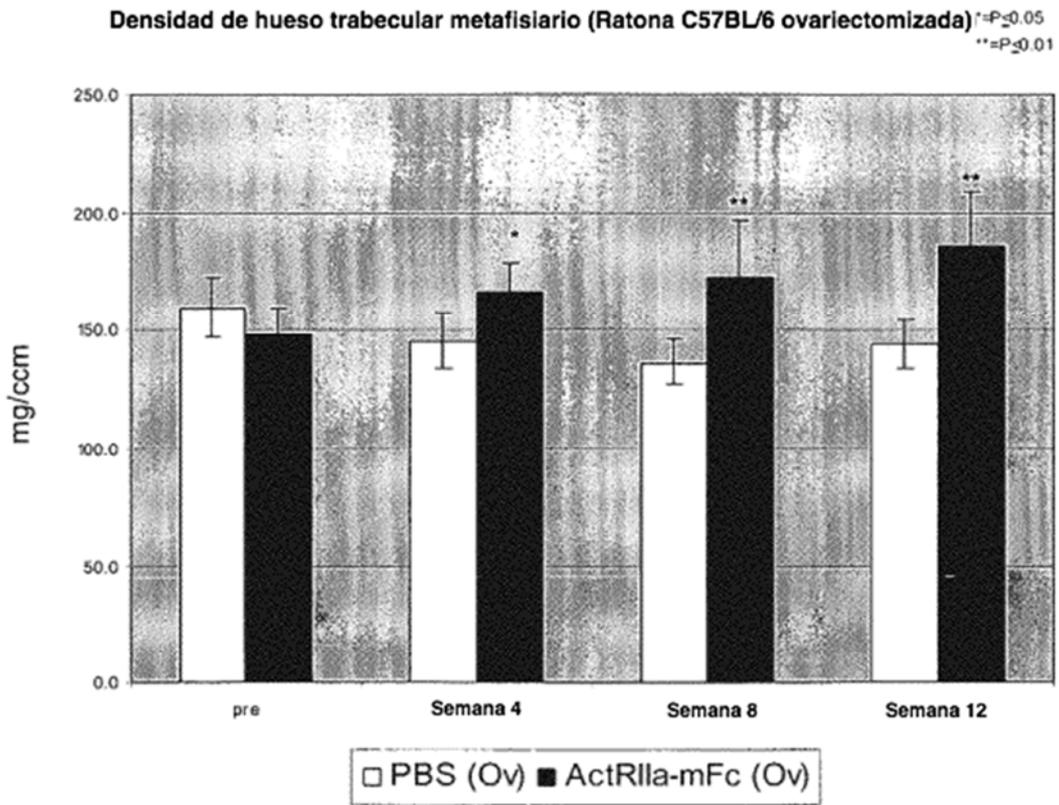


Figura 12

Densidad de hueso trabecular metafisiario (Ratón C57BL/6 operado simulado)

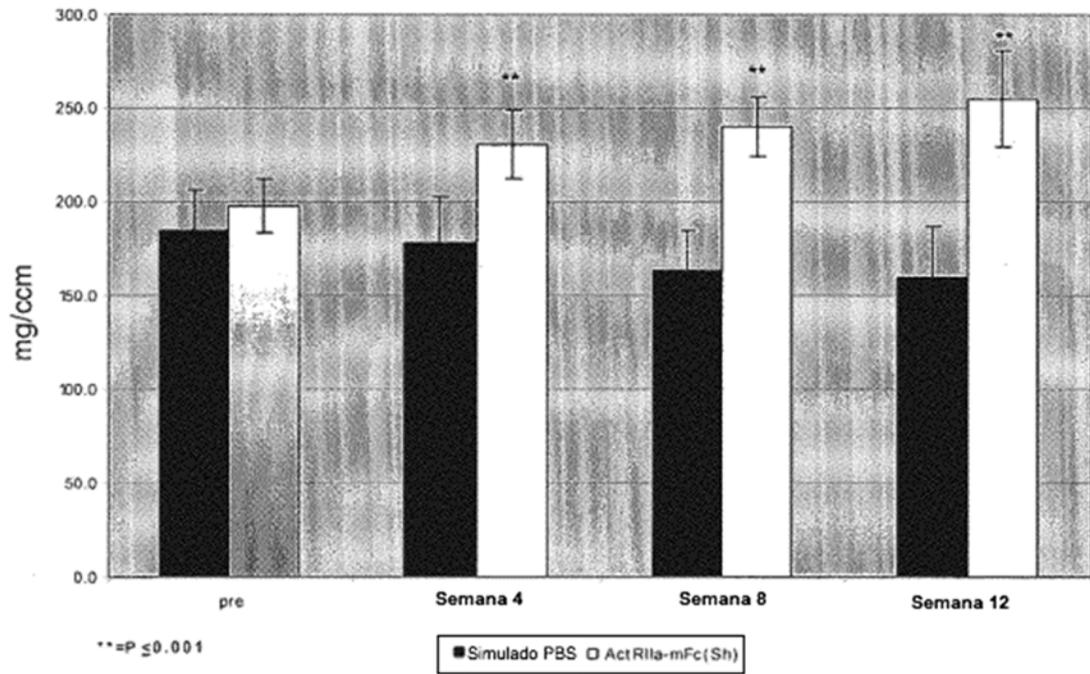


Figura 13

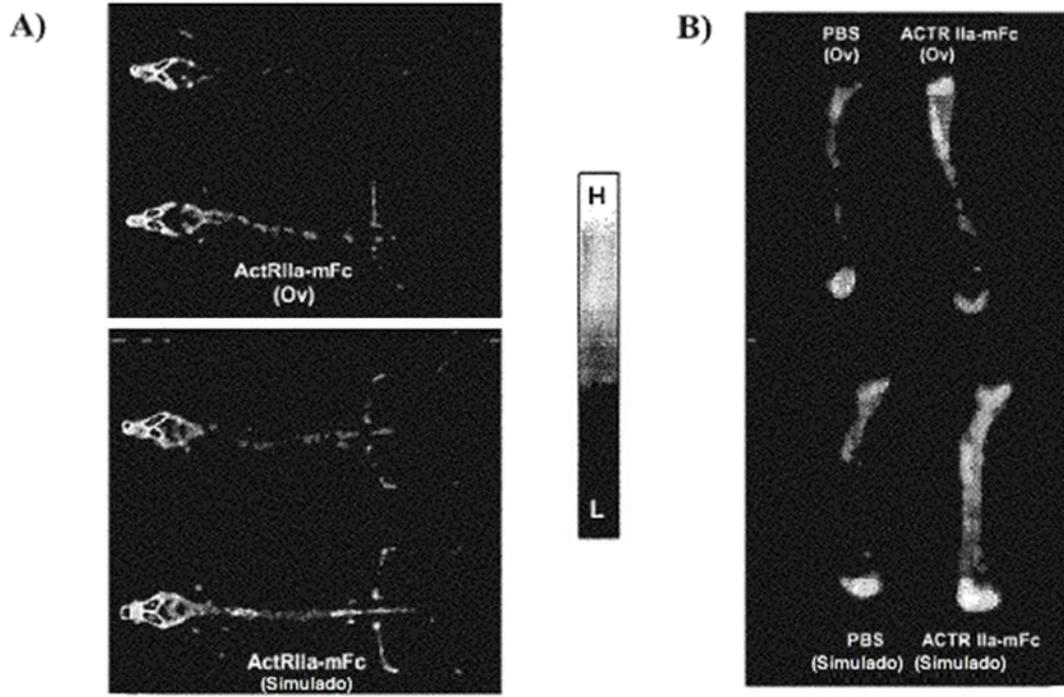


Figura 14

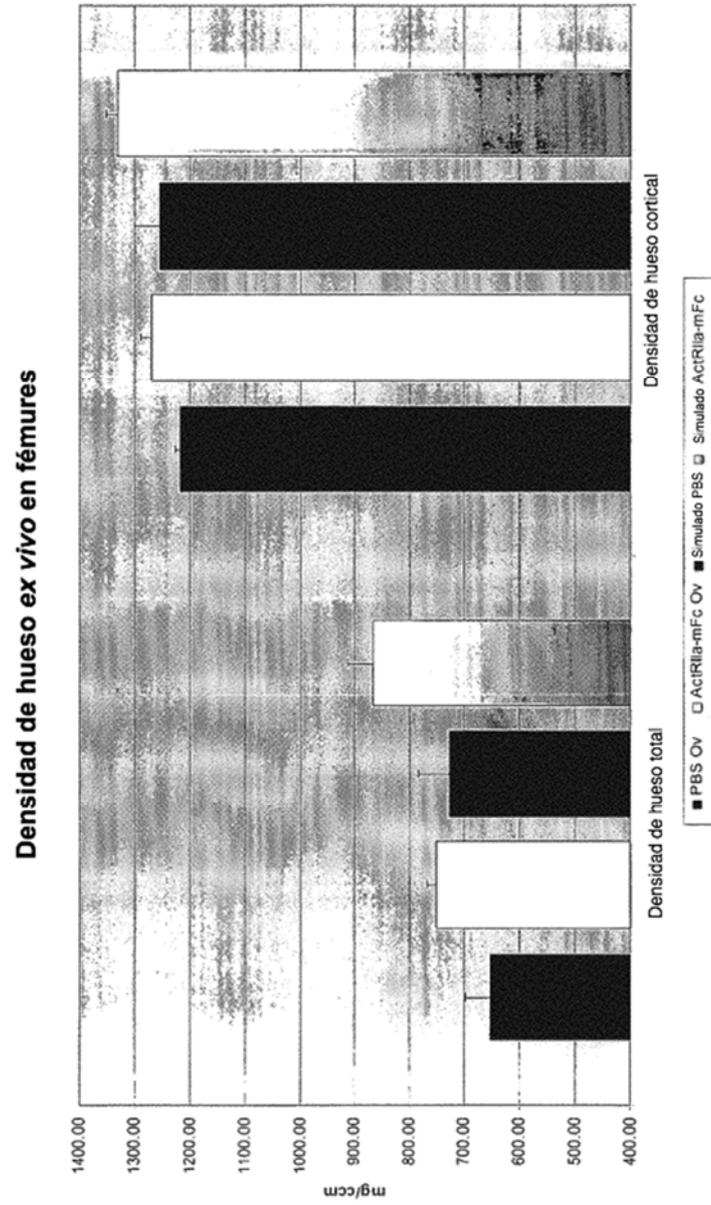


Figura 15

Contenido de hueso diafisario de fémures

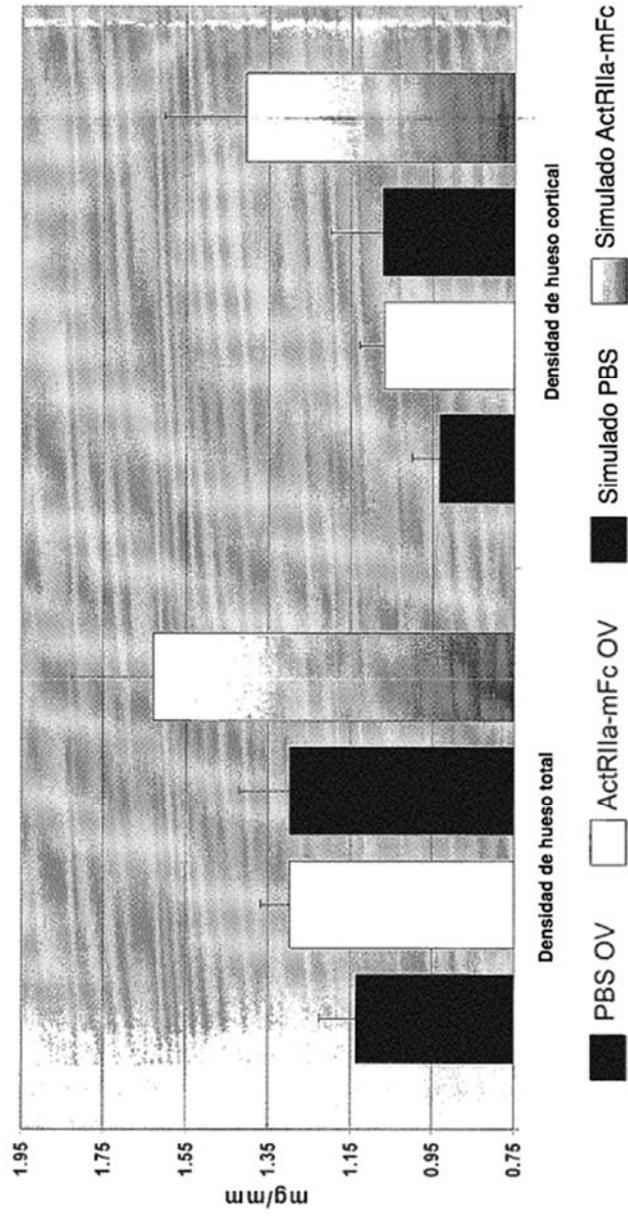


Figura 16

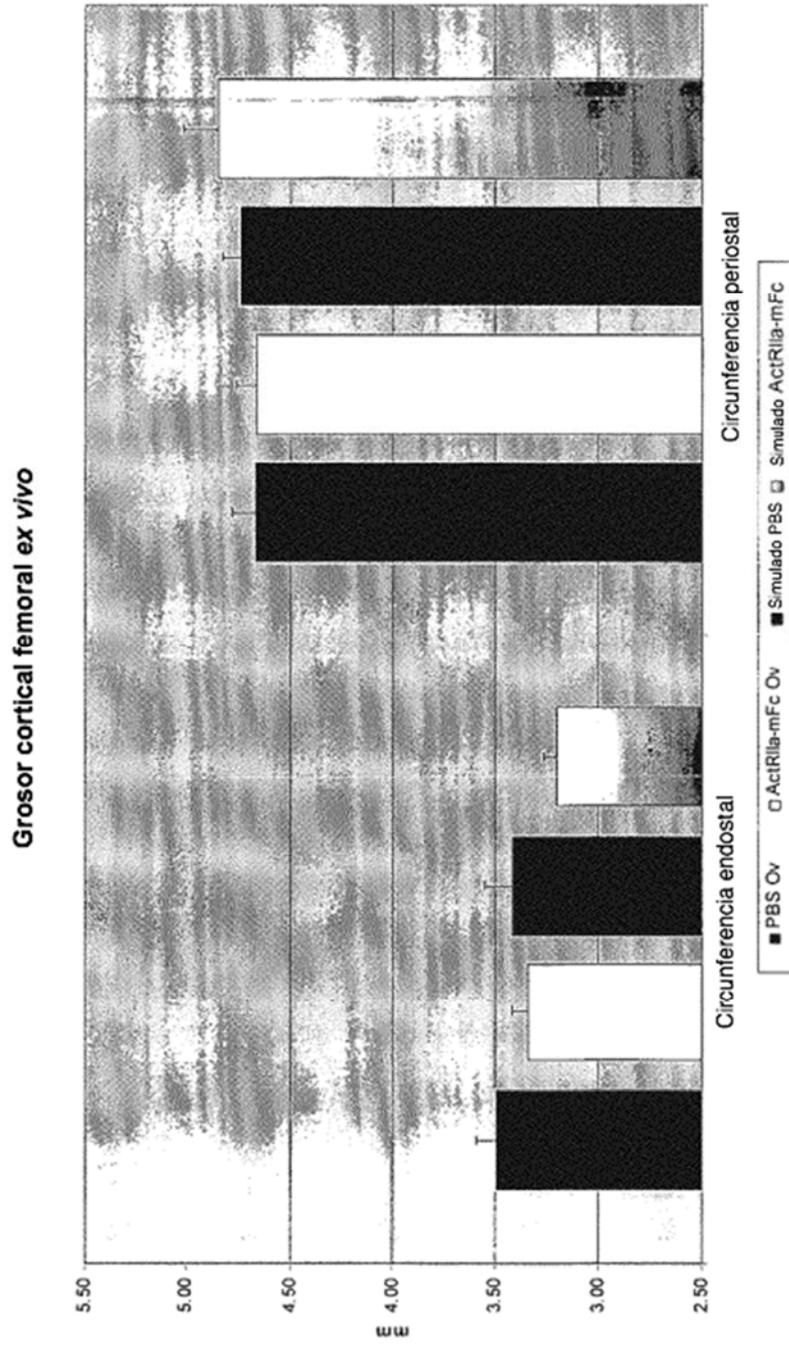


Figura 17

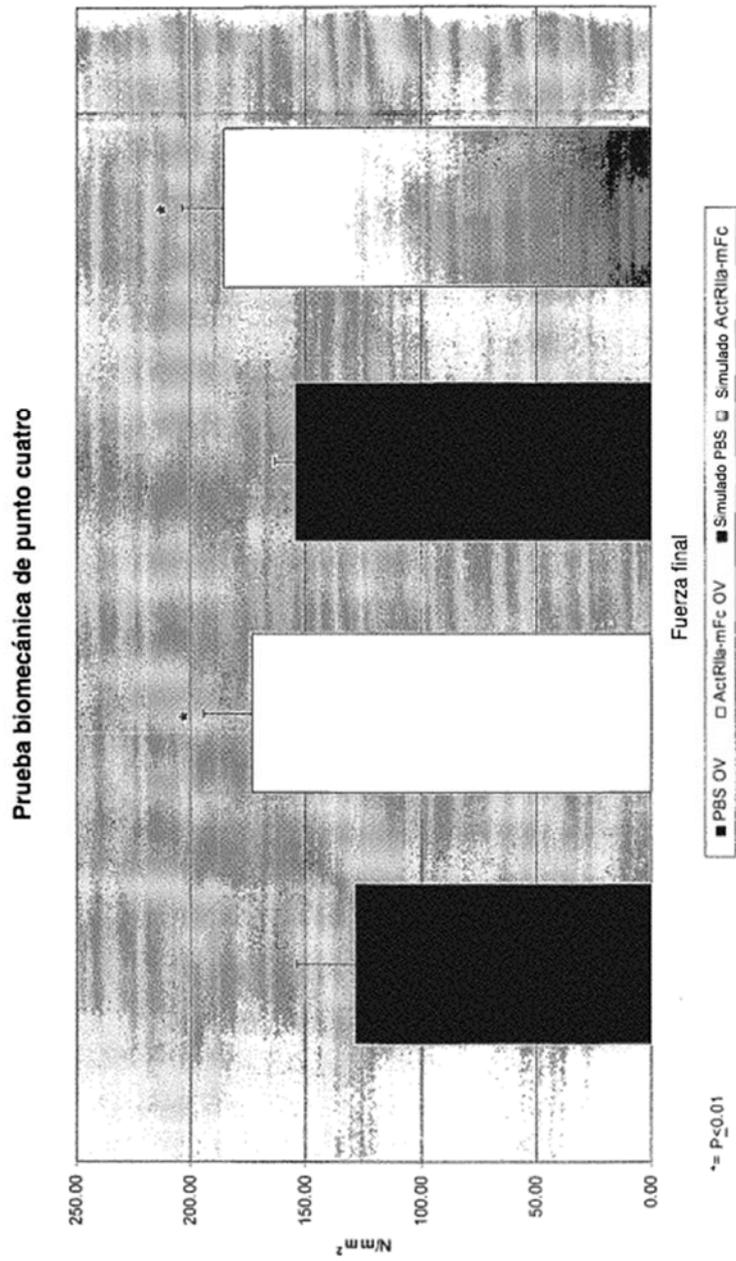
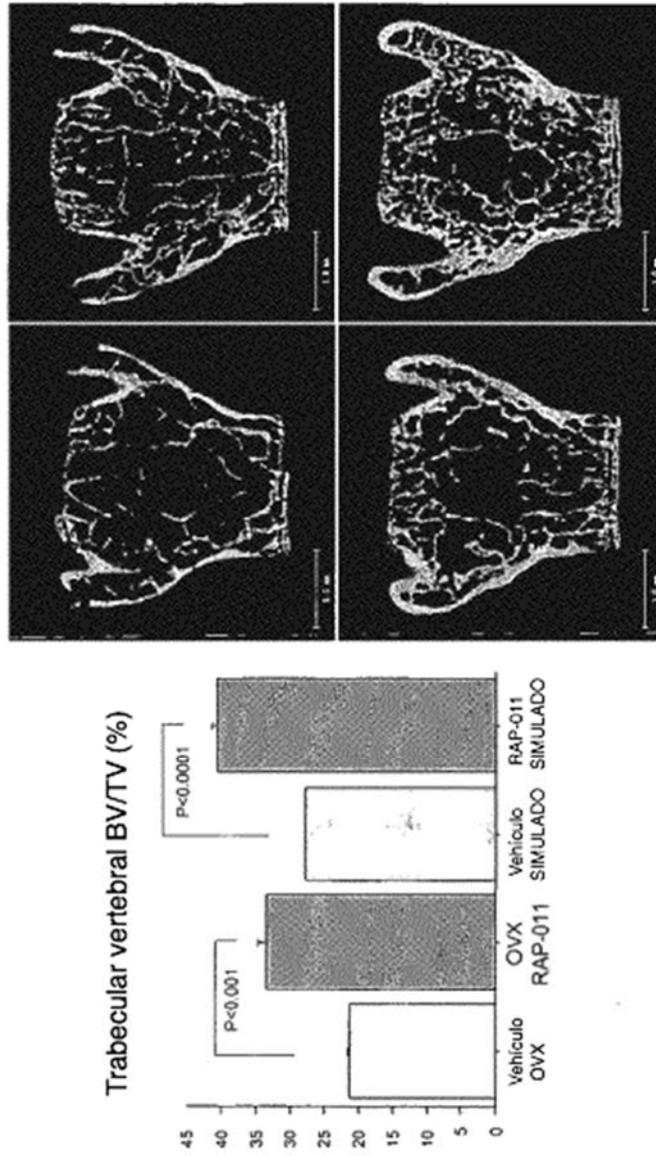
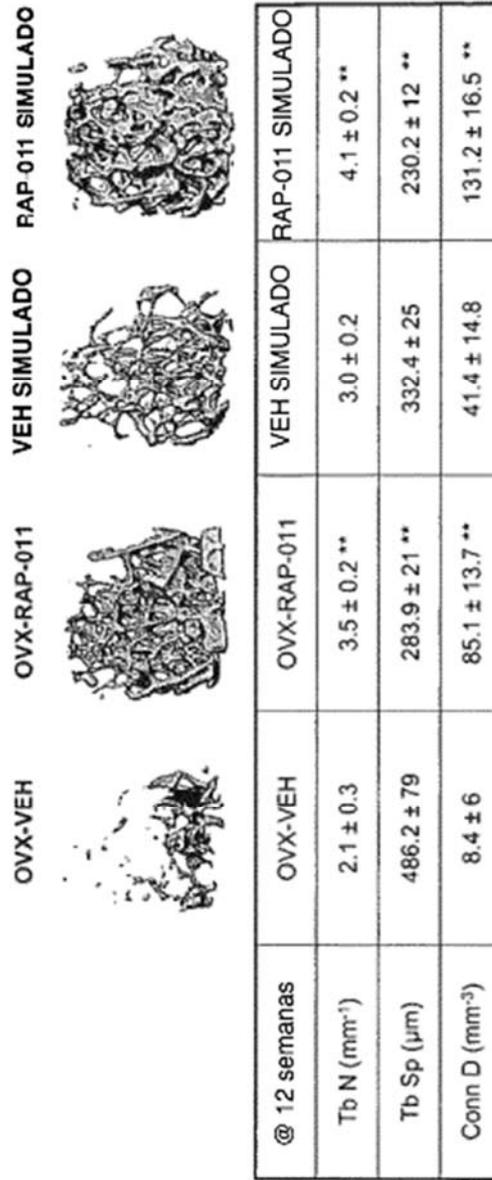


Figura 18



Datos de microTC mostrados al final del estudio (edad 24 semanas)

Figura 19



** p < 0.01 vs VEH

Figura 20

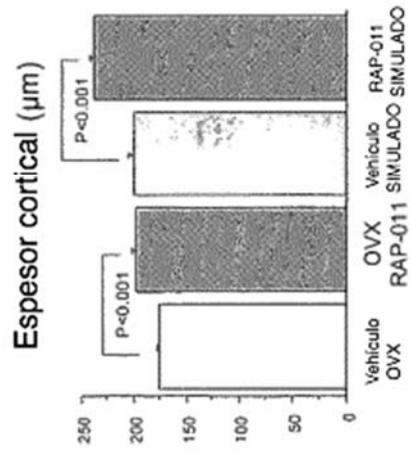
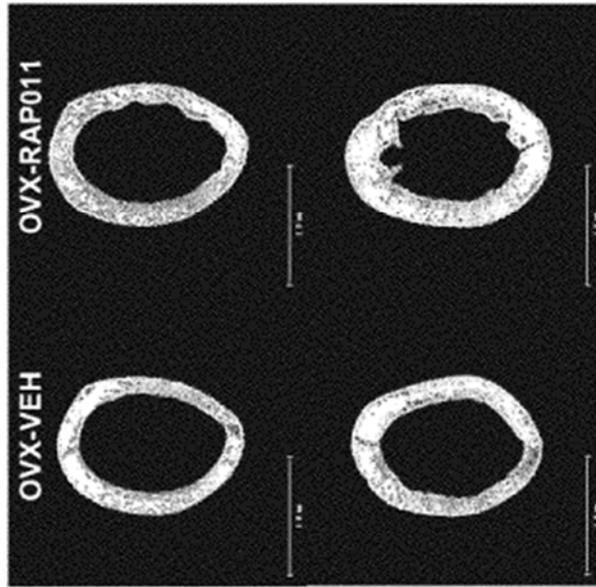


Figura 21

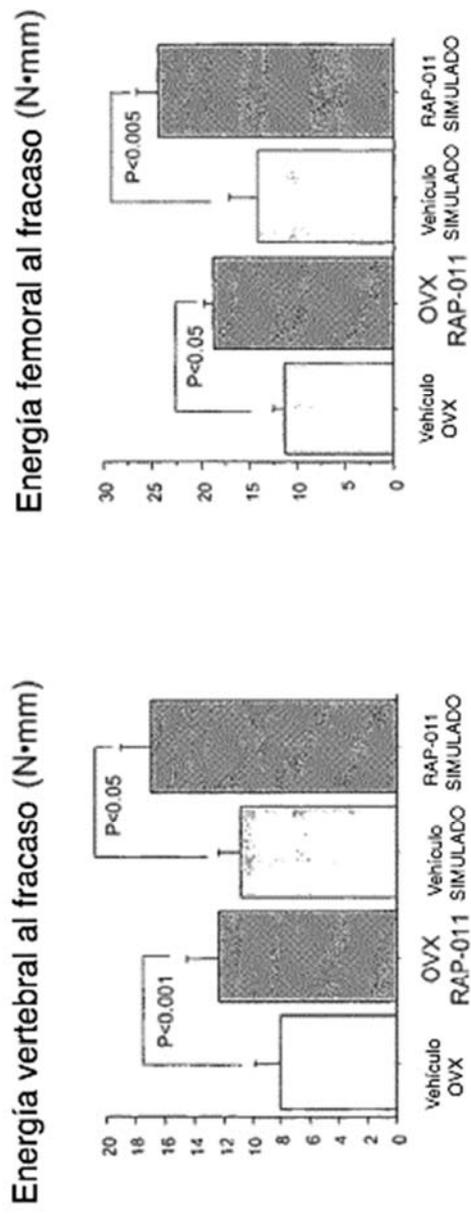


Figura 22

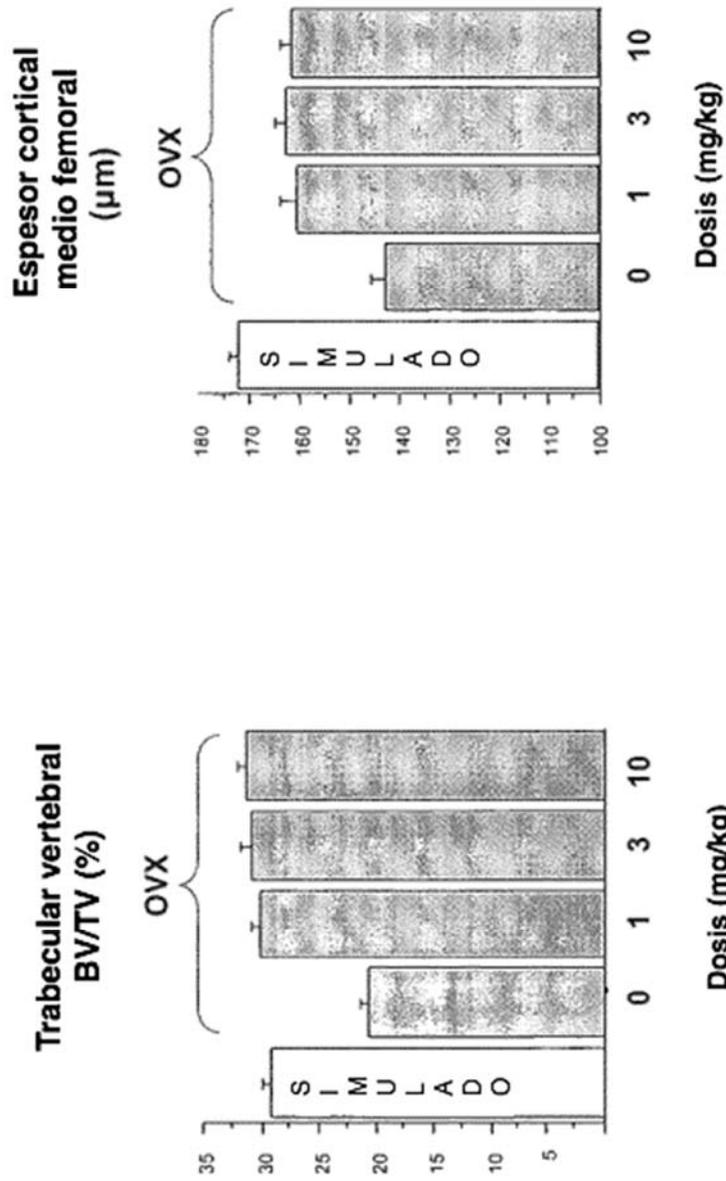


Figura 23

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/Bs (%)	MAR (um/dia)	BFR/BSd (um ³ /um ² /dia)
Media PBS	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
Media RAP-011	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
<i>Valor P</i>	<i>0.002</i>	<i>0.03</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>	<i>0.008</i>	<i>0.03</i>	<i>0.002</i>

Figura 24

Parámetro	Semana 2 VEH (N=6)	Semana 2 RAP-011 (N=6)	Semana 4 VEH (N=6)	Semana 4 RAP-011 (N=6)	Semana 6 VEH (N=8)	Semana 6 RAP-011 (N=8)	Semana 12 VEH (N=6)	Semana 12 RAP-011 (N=6)
Volumen de hueso (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.45 *	7.04 ± 0.51	15.57 ± 1.39 *	6.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53 *	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08 *
Superficie osteoide (OS/BS), %	4.86 ± 0.34	5.32 ± 0.49	3.95 ± 0.51	3.65 ± 0.36	3.26 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
Superficie erosionada (ES/BS), %	17.36 ± 0.99	13.93 ± 0.96 *	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.38 ± 1.31	11.39 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Número de osteoblastos/área (Ob/Tar), no./mm	429.89 ± 25.33	455.31 ± 28.29	411.84 ± 44.61	567.78 ± 53.13 *	405.22 ± 24.2	634.61 ± 35.39 *	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77 *
Superficie de osteoblastos/superficie de hueso (Obs/BS), %	36.12 ± 2.42	29.43 ± 1.52 *	33.5 ± 2.53	29.14 ± 1.93	35.5 ± 1.27	35.32 ± 1.29	28.45 ± 1.32	30.24 ± 1.5
Osteoblasto en perímetro de hueso (Nob/BPm), %	49.33 ± 2.52	40.89 ± 1.46 *	48.52 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.26	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53
Número de osteoclastos/área (Oc/Tar), no./mm	65.81 ± 4.97	59.62 ± 5.89	51.42 ± 3.58	65.68 ± 8.18	45.23 ± 3.98	62.95 ± 5.18 *	28.07 ± 1.85	61.15 ± 1.87 *
Osteoclasto en perímetro de hueso (Noc/BPm), %	7.55 ± 0.53	5.34 ± 0.45 *	6.25 ± 0.66	4.78 ± 0.59	5.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
Superficie de osteoclastos/superficie de hueso (OcSBS), %	8.78 ± 0.78	6.23 ± 0.5 *	6.86 ± 0.67	5.36 ± 0.62	6.38 ± 0.67	5.8 ± 0.46	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Espesor trabecular (TbTh), -m	13.59 ± .48	15.42 ± 0.45 *	13.11 ± 0.46	17.68 ± 0.75 *	12.04 ± 0.5	17.28 ± 0.35 *	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02 *
Separación trabecular (TbSp), -m	167.74 ± 5.88	127.57 ± 7.25 *	175.98 ± 9.3	98.61 ± 6.95 *	187 ± 7.13	104.26 ± 3.42 *	251.79 ± 18.14	98.07 ± 4.27 *
Número trabecular (TbN), no./mm	5.55 ± 0.19	7.09 ± 0.36 *	5.34 ± 0.23	8.73 ± 0.5 *	5.07 ± 0.18	8.27 ± 0.22 *	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29 *
Superficie que mineraliza (MS/BS), %	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73 *	4.15 ± 1.02	8.84 ± 0.77 *	3.6 ± 0.56	7.97 ± 0.73 *	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51 *
Tasa de aposición mineral (mm/día)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.028 *	0.566 ± 0.042	0.642 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.602 ± 0.016 *	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013 *
Tasa de formación de hueso (-m ³ /um ² /día)	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.008 *	0.025 ± 0.008	0.067 ± 0.005 *	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004 *	0.016 ± 0.002	0.035 ± 0.002 *

Figura 25

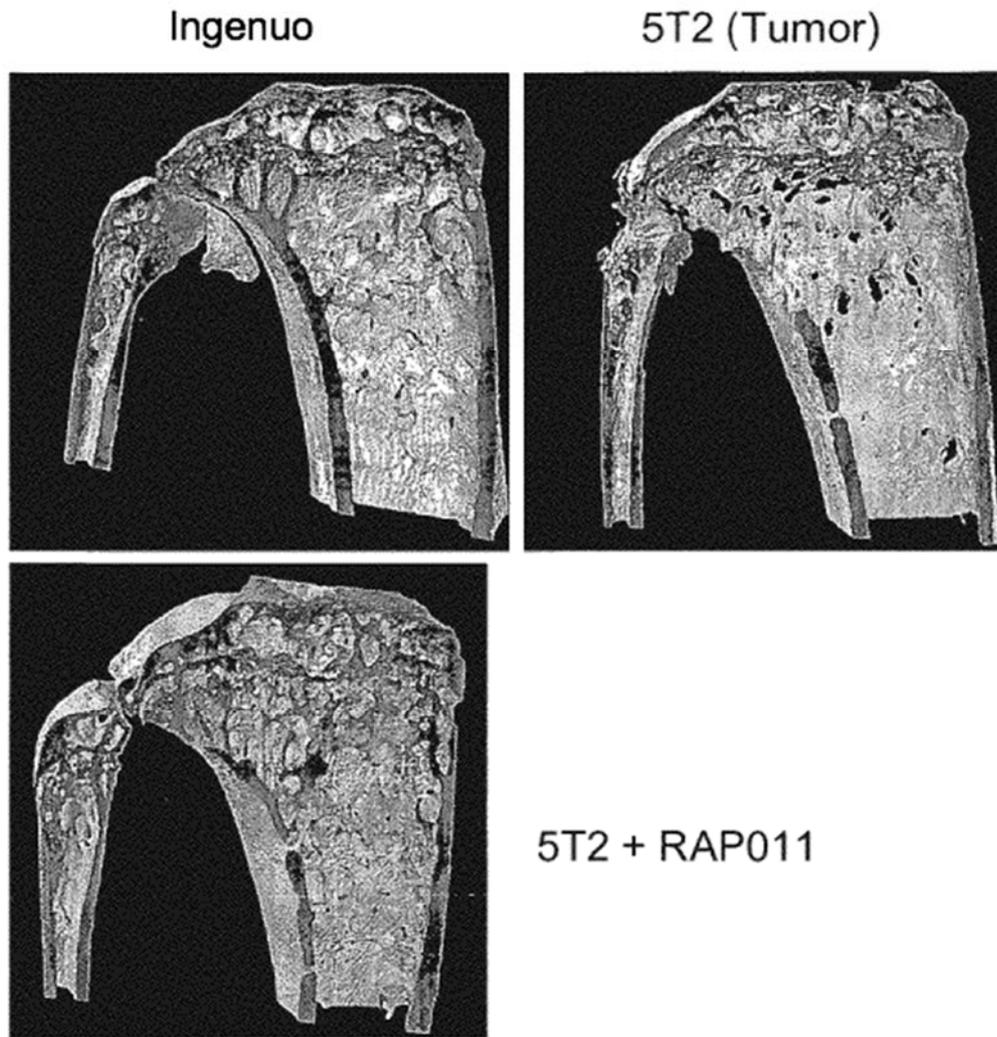


Figura 26

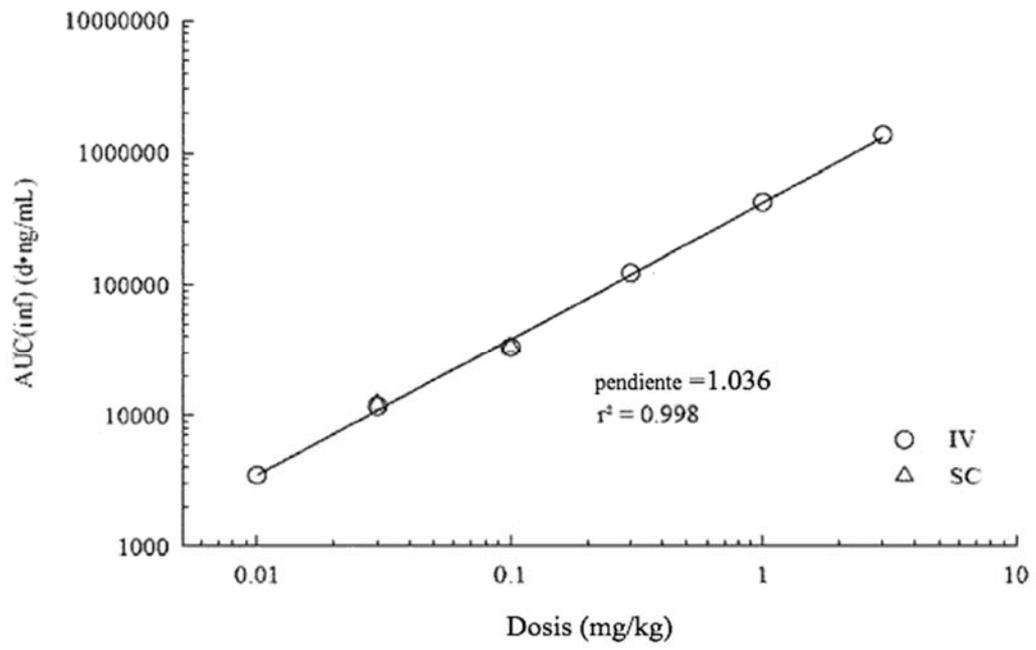


Figura 27

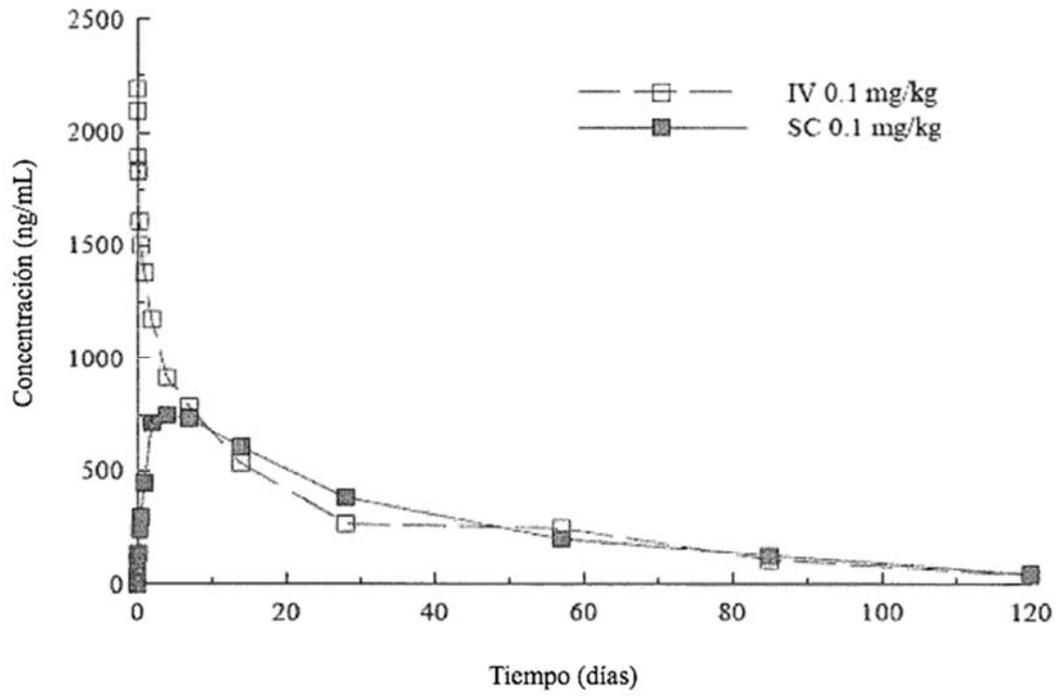


Figura 28

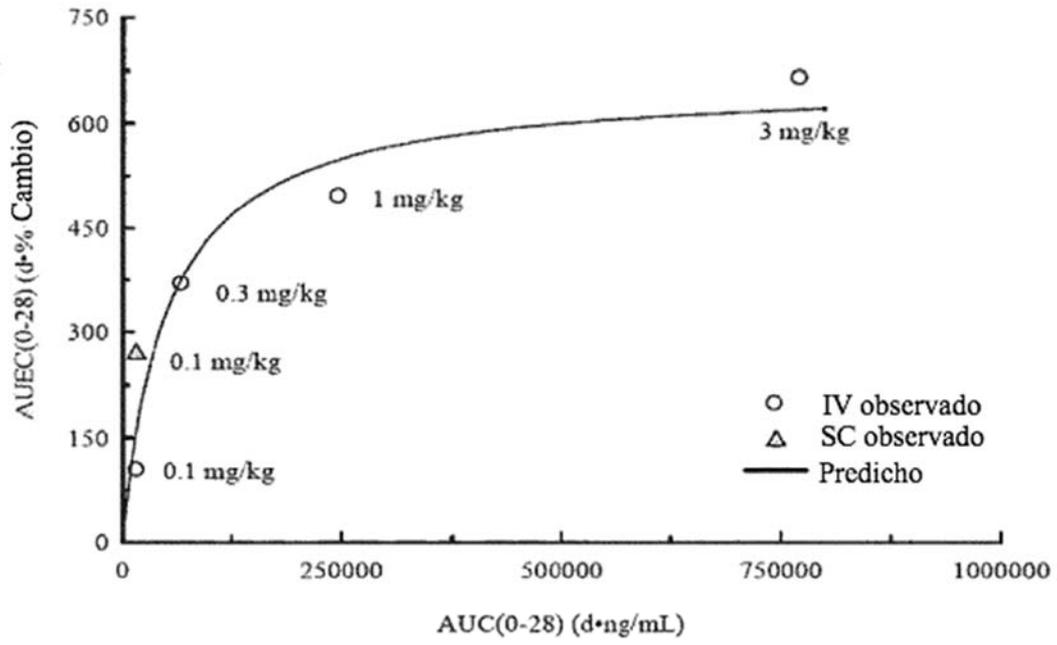


Figura 29

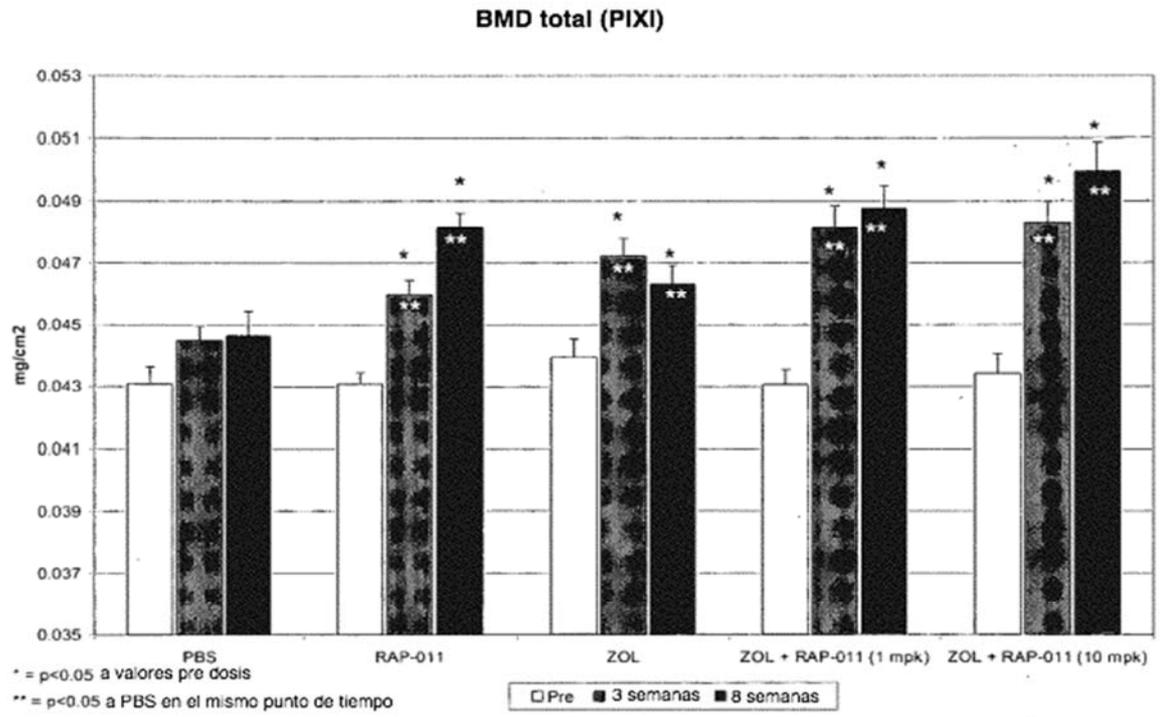


Figura 30