



DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ METODOS PARA AUMENTAR LOS ADIPOCTOS TERMOGENICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ ACCELERON PHARMA INC.

DOMICILIO _____ CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-002090- -00000-0000

Fecha: 2012-01-06 11:26:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ACCELERON PHARMA INC. Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América Dirección: 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139, Estados Unidos de América Domicilio: Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de América	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	1. John KNOPF 147 Robbins Drive, Carlisle, Massachusetts 01741, Estados Unidos de América 2. Jasbir SEEHRA 3 Lincoln Terrace, Lexington, Massachusetts 02421-6818, Estados Unidos de América 3. Ravindra KUMAR 421 Arlington Street, Acton, Massachusetts 01720, Estados Unidos de América	
5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2010/037779</u> Fecha: <u>08 de junio de 2010</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2010/144452</u> Fecha: <u>16 de diciembre de 2010</u>	
6 Título (54)	<u>MÉTODOS PARA AUMENTAR LOS ADIPOCITOS TERMOGÉNICOS</u>	
7 Clasificación Internacional (51)	<u>C07K 014/705</u>	

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	08 de junio de 2009	61/268,128
	US	10 de septiembre de 2009	61,276,422
	US	03 de noviembre de 2009	61/280,545

9	Comprobante de pago No.: <u>12-000329</u>	Fecha: <u>02 de enero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-126491</u>	Fecha: <u>28 de diciembre de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-126492</u>	Fecha: <u>28 de diciembre de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-000081</u>	Fecha: <u>02 de enero de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-000333</u>	Fecha: <u>02 de enero de 2012</u>

10	Anexos:
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.
☒	Comprobante de pago por 22 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$660.000.oo.
☐	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
☐	Poder, si fuere el caso
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
☐	Declaraciones.
☐	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☒	Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2010/144452 A1.
☒	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☐	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
☒	Arte final 12x12
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

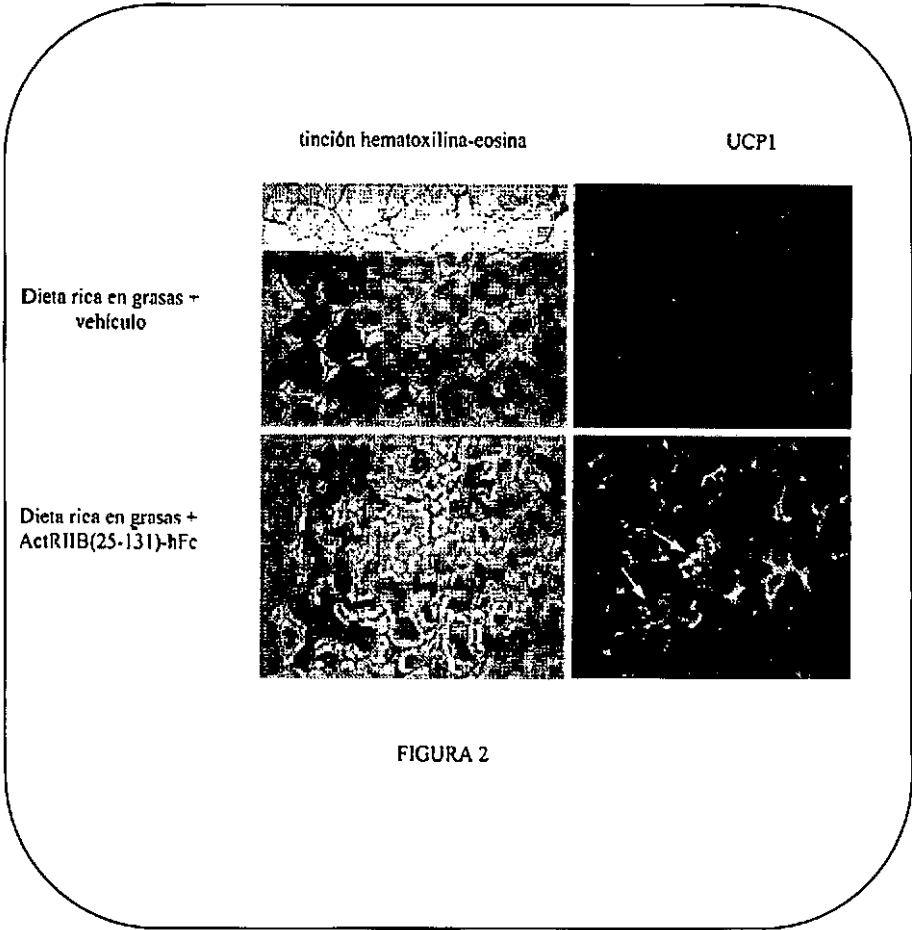


FIGURA 2

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : *LUZ CLEMENCIA DE PAEZ*
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/144452 A1

Descripción:

Páginas 75 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 14

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ **Forma PCT/ISA/237.** Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
16 December 2010 (16.12.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/144452 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/037779

(22) International Filing Date:
8 June 2010 (08.06.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/268,128 8 June 2009 (08.06.2009) US
61/276,422 10 September 2009 (10.09.2009) US
61/280,545 3 November 2009 (03.11.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AC-
CELERON PHARMA INC. [US/US]; 128 Sidney
Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KNOPE, John [US/
US]; 147 Robbins Drive, Carlisle, MA 01741 (US).
SEEHRA, Jasbir [US/US]; 3 Lincoln Terrace, Lexing-

ton, MA 02421-6818 (US). KUMAR, Ravindra
[US/US]; 421 Arlington Street, Acton, MA 01720 (US).

(74) Agents: VARMA, Anita et al.; Ropes & Gray LLP, Pru-
dential Tower, 800 Boylston Street, Boston, MA
02199-3600 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR INCREASING THERMOGENIC ADIPOCYTES

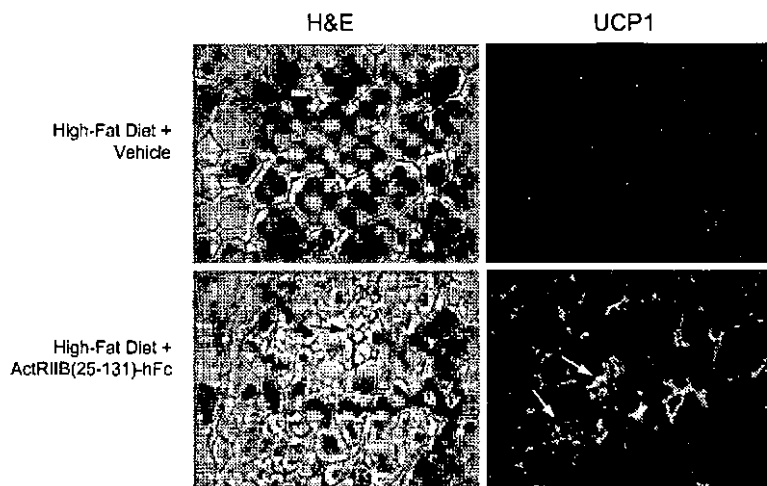


FIGURE 2

(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for increasing thermogenic adipocytes (e.g., brown adipocytes or other UCP-1 expressing adipocytes) by administering an antagonist of an ActRIIB signaling pathway. Examples of such antagonists include ActRIIB polypeptides, anti-ActRIIB antibodies, anti-myostatin antibodies, anti-GDF3 antibodies, anti-Nodal, anti-activin, and anti-GDF11 antibodies. A variety of metabolic and other disorders may be treated by causing an increase in thermogenic adipocytes.

WO 2010/144452 A1

WO 2010/144452 A1

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, — before the expiration of the time limit for amending the
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, claims and to be republished in the event of receipt of
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). amendments (Rule 48.2(h))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

7

MÉTODOS PARA AUMENTAR LOS ADIPOCITOS TERMOGÉNICOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos No. de Serie 61/268,128, radicada en junio 8, 2009, 61/276,422, radicada en septiembre 10, 2009, y 61/280,545, radicada en noviembre 3, 2009. Todas las enseñanzas de las solicitudes arriba mencionadas se incorporan a la presente a través de las referencias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células grasas de los mamíferos se dividen tradicionalmente en adipocitos blancos que almacenan energía y adipocitos marrón que disipan energía. Los adipocitos marrón expresan la proteína desacopladora 1 (UCP1), la cual convierte la energía bioquímica en calor al desacoplar la producción de ATP del gradiente de protones mitocondrial (Cannon et al., 2004, *Physiol Rev* 84:277-359). Esa termogénesis sirve para mantener la temperatura del cuerpo en condiciones ambientales frías o para promover el equilibrio de energía en caso de una ingesta calórica excesiva. En consonancia con la importancia que tiene la grasa marrón para el metabolismo, la ablación genética de dicha grasa en ratones puede causar obesidad severa acompañada de resistencia a la insulina, hiperglicemia e hipercolesterolemia (Lowell et al., 1993, *Nature* 366:740-742; Hamann et al., 1995, *Diabetes* 44:1266-1273; Hamann et al., 1996, *Endocrinology* 137:21-29). Dado el papel de la UCP-1 como una proteína desacopladora de gran importancia, los adipocitos que expresan UCP-1 tendrán una actividad termogénica.

En los seres humanos, el tejido adiposo marrón desempeña un importante papel termogénico en los infantes, pero se reduce a lo largo del desarrollo post-natal y durante mucho tiempo se ha considerado como escaso y clínicamente insignificante en los adultos. Sin embargo, algunos hallazgos recientes le han dado un vuelco a esta manera de concebir estos tejidos y han generado un interés considerable en el (los) papel(es) del tejido adiposo marrón en la adultez. En concreto, del uso combinado de tomografía por emisión de positrones y tomografía computarizada (PET-CT) para monitorear las metástasis de tumores se produjo la detección casual de presuntos depósitos de grasa marrón altamente

8

activos en un porcentaje sustancial de adultos (Nedergaard et al., 2007, Am J Physiol Endocrinol Metab 293:E444-E452). En estudios posteriores realizados en adultos saludables se ha confirmado que se trata efectivamente de depósitos de grasa marrón funcional que expresa UCP-1 (Virtanen et al., 2009, N Engl J Med 360:1518-1525), en donde se observó actividad del tejido adiposo marrón durante la exposición al frío pero no en condiciones termoneutras en más del 90% de los hombres jóvenes bajo estudio (van Marken Lichtenbelt et al., 2009, N Engl J Med 360: 1500-1508). Más aún, un análisis retrospectivo de cerca de dos mil PET-CT scans realizado por diversos motivos de diagnóstico indica que la cantidad de grasa marrón activa está en correlación inversa al índice de masa corporal, una medida que se usa extensamente para la adiposidad global, lo cual indica que la grasa marrón puede tener funciones benéficas para el metabolismo humano de los adultos (Cypess et al., 2009, N Engl J Med 360:1509-1517). La función de los adipocitos termogénicos (por ejemplo, adipocitos marrón u otros adipocitos que expresan UCP-1) entremezclados con el tejido adiposo blanco es menos evidente.

Dada la importancia de los adipocitos termogénicos en las actividades metabólicas, existe la necesidad de agentes que aumenten (por ejemplo por formación y/o aumento de la actividad) los adipocitos termogénicos en vivo.

RESUMEN DE LA INVENCION

En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a métodos para aumentar los adipocitos termogénicos en paciente por medio del uso de antagonistas de la ruta de señalización mediada por ActRIIB. Tales antagonistas pueden ser, por ejemplo, proteínas ActRIIB solubles (por ejemplo, proteínas de fusión ActRIIB-Fc), antagonistas que se enlazan con ActRIIB o inhiben la expresión de ActRIIB y antagonistas que se enlazan con o inhiben la expresión de ligandos que señalizan a través de ActRIIB y participan en la regulación de los adipocitos termogénicos. Entre esos ligandos se cuentan la miostatina (o GDF8), el GDF3, activinas (por ejemplo, activina A, B, C o E), GDF11 y Nodal.

En ciertos aspectos, esta divulgación se refiere a métodos para aumentar los adipocitos termogénicos por medio de la administración a pacientes que lo requieran una

cantidad efectiva de un polipéptido relacionado con ActRIIB. Un polipéptido relacionado con ActRIIB puede ser un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio extracelular de ActRIIB o una porción del mismo) que se enlace a un ligando de ActRIIB como GDF3, GDF8, GDF11, activina o Nodal. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB se enlaza a un ligando de ActRIIB con una K_d inferior a 10 micromoles o inferior a 1 micromol, 100, 10 o 1 nanomol. Se ha descrito una variedad de polipéptidos ActRIIB en las siguientes solicitudes de patente PCT, todas ellas incorporadas a la presente solicitud por referencia: WO 00/43781, WO 04/039948, WO 06/012627, WO 07/053775, WO 08/097541 y WO 08/109167. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB inhibe la señalización mediada por ActRIIB, como por ejemplo los eventos intracelulares de transducción de señal que son detonados por un ligando de ActRIIB. El polipéptido soluble ActRIIB para ser usado en una preparación de ese tipo puede ser cualquiera de los que aquí se divulgan, tal como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las secuencias con los siguientes números SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, 12, 14 y 17, o que tenga una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las secuencias con los siguientes números SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, 12, 14 y 17. Un polipéptido soluble ActRIIB puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, como puede ser uno que comprenda por lo menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de entre las secuencias con los siguientes números SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, 12, 14 y 17 o de una secuencia SEQ ID NO: 1, que carecen de 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 aminoácidos en C-terminal o carece de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el N-terminal. Alternativamente, los polipéptidos comprenderán un truncamiento relacionado con una secuencia SEQ ID NO: 1 de entre 2 y 5 aminoácidos en el N-terminal y de máximo 3 aminoácidos en el C-terminal. Otro polipéptido es el que se presenta como SEQ ID NO: 12. Un polipéptido soluble ActRIIB puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de enlazamiento del ligando) con respecto a un polipéptido ActRIIB que se presenta de forma natural. La alteración de la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce

en una célula de mamífero, insecto o cualquier otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con respecto a un polipéptido ActRIIB que se presenta de forma natural. Un polipéptido soluble ActRIIB puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio de enlace del ligando de una ActRIIB o una variante del mismo) y uno más dominios adicionales que presentan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación simplificada, direccionamiento a tejidos específicos, etc. por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar alguno o varios de los siguientes: estabilidad en vivo, la vida media en vivo, ingesta/administración, localización de tejidos o distribución en los tejidos, formación de complejos proteínicos, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Una proteína de fusión ActRIIB soluble puede incluir un dominio constante de inmunoglobulina, como por ejemplo un dominio Fc (de tipo silvestre o mutante) o una albúmina sérica. En ciertos modos de realización, una fusión de ActRIIB-Fc consiste en un enlazador relativamente no estructurado posicionado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIB. Este enlazador no estructurado puede corresponder a grandes rasgos a la región 15 de aminoácidos no estructurados en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola") o puede ser una secuencia artificial de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que se encuentran relativamente libres de una estructura secundaria. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetidas de tronina/serina y glicinas, como puede ser la repetición de TG₄ (SEQ ID NO: 18) o SG₄ (SEQ ID NO: 19). Una proteína de fusión puede incluir una secuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST. Alternativamente, un polipéptido soluble ActRIIB incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre los siguientes: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un agente derivatizador orgánico. En general, es preferible que una proteína ActRIIB se exprese en una línea de células de mamífero que medie adecuadamente la glicosilación natural de la proteína ActRIIB para así reducir el riesgo de una respuesta inmune

11

desfavorable en los pacientes. Las líneas celulares humanas y CHO se han usado exitosamente y es de esperarse que otros vectores comunes de expresión de mamíferos resulten igualmente útiles.

En ciertos aspectos, un compuesto divulgado por medio de la presente puede ser formulado coma una preparación farmacéutica. Una preparación farmacéutica puede incluir uno o más compuestos adicionales, tal como un compuesto que sea usado para tratar un trastorno relacionado con el ActRIIB. Preferiblemente, la sustancia farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos.

En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido soluble ActRIIB, los cuales no codifican un polipéptido ActRIIB completo. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de codificación para un polipéptido soluble ActRIIB, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una codificación de secuencia para un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de enlazamiento del ligando) de un ActRIIB y una secuencia que codificaría por una porción o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRIIB, salvo por un codón de terminación posicionado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia polinucleótida completa de ActRIIB, como sería SEQ ID NO: 4, o una versión truncada parcialmente, en donde dicho polinucleótido aislado comprende además un codón de terminación de la transcripción por lo menos seiscientos nucleótidos antes del 3'-terminal o posicionado de tal manera que la traducción del polinucleótido produce un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una porción truncada de un ActRIIB completo. Los ácidos nucleicos que se divulgan por medio del presente pueden estar ligados operativamente a un promotor de la expresión, y esta publicación se refiere a células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente la célula es una célula de mamífero, como por ejemplo una célula CHO.

En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a métodos para producir un polipéptido soluble ActRIIB. Un método puede ser expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) que se divulgan por medio del presente en una célula adecuada, tal como una célula derivada del ovario del hámster chino (CHO). Dicho método puede consistir en: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido soluble ActRIIB, en donde dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActRIIB soluble y b) recuperar el polipéptido soluble ActRIIB que se expresa de esa manera. Los polipéptidos solubles ActRIIB pueden ser recuperados como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas utilizando cualquiera de las técnicas ampliamente conocidas para la obtención de proteínas a partir del cultivo de células.

En ciertos aspectos, aumentar los adipocitos termogénicos utilizando alguno de los compuestos que aquí se describen puede ser útil para el manejo de una variedad de trastornos para los cuales resulta benéfico el manejo las actividades metabólicas. Algunos ejemplos son el manejo de la obesidad, por medio de la reducción del contenido de grasa corporal o de la reducción del índice de aumento de la grasa corporal, y el tratamiento de trastornos como la obesidad, diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID), diabetes tipo 2, trastornos cardiovasculares, cáncer, hipertensión, accidente cerebrovascular, problemas respiratorios, dislipidemia, lipodistrofia, consecuencias de la administración de corticoesteroides y trastornos de la vesícula biliar.

En ciertos aspectos, un polipéptido soluble ActRIIB como se divulga por medio del presente puede ser utilizado en un método para tratar a un individuo que presente un trastorno relacionado con pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente en donde dicho trastorno también se encuentra relacionado con un trastorno metabólico, tal como obesidad, lipodistrofia, diabetes (por ejemplo, diabetes tipo II), caquexia u otro de los trastornos arriba descrito. Entre dichos trastornos se encuentran distrofia muscular, sarcopenia y VIH (que puede estar asociado c desgaste muscular y lipodistrofia).

En ciertos aspectos, esta divulgación se refiere a métodos para la actividad antagonista de un polipéptido ActRIIB o un ligando de ActRIIB (por ejemplo, GDF8, GDF11, activina, GDF3 y Nodal) en una célula. Los métodos consisten en contactar la célula con un polipéptido soluble ActRIIB. Alternativamente, se monitorea la actividad de un polipéptido ActRIIB o de un ligando de ActRIIB por una transducción de señal mediada por el complejo ActRIIB/ligando de ActRIIB, por ejemplo, monitoreando la proliferación celular o el nivel de expresión de la UCP-I. Las células empleadas en los métodos incluyen osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos y células musculares.

En ciertos aspectos, esta divulgación se refiere a los usos de un polipéptido soluble ActRIIB para producir un medicamento para el tratamiento de trastornos o condiciones que se describen en el presente.

En ciertos aspectos, esta divulgación se refiere a métodos para incrementar los adipocitos termogénicos en pacientes que así lo requieran, y dicho método puede consistir en la administración de una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consta de los siguientes: un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en por lo menos 90% a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:2 y un polipéptido codificado por un ácido nucleico que se hibride bajo rigurosas condiciones de hibridación a un ácido nucleico de SEQ ID NO:3. El polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprenda una porción heteróloga. El polipéptido puede ser un dímero. El polipéptido puede fusionarse a un dominio constante de una inmunoglobulina. El polipéptido puede fusionarse a una porción Fc de una inmunoglobulina, como por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en por lo menos 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a una secuencia de aminoácidos 29-109, 29-128, 29-131, 29-134, 25-109, 25-128, 25-131, 25-134 o 20-134 de SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en por lo menos 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, 6, 12, 14 o 17. Un paciente que sea tratado con un compuesto de este orden puede ser alguien que sufra de alguno de los trastornos que se describen en el presente, por ejemplo, un trastorno metabólico (por

ejemplo, obesidad, diabetes, síndrome metabólico, dislipidemia o lipodistrofia) o un trastorno muscular asociado con un trastorno metabólico (por ejemplo, ciertas instancias de sarcopenia). La administración del compuesto puede promover la expresión de UCP-I en adipocitos del paciente bajo tratamiento, opcionalmente en el tejido adiposo blanco.

En ciertos aspectos, esta divulgación se refiere a métodos para incrementar los adipocitos termogénicos en pacientes que así lo requieran, y un método puede consistir en la administración de una cantidad efectiva de un compuesto que inhiba la ruta de señalización mediada por ActRIIB, que tenga como objetivo bien sea ActRIIB o un ligando que señalice por medio de ActRIIB. Algunos ejemplos de estos compuestos son antagonistas de ActRIIB, antagonistas de miostatina (por ejemplo, GDF-8); antagonistas de activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C o activina E); antagonistas de GDF-11; antagonistas de Nodal; y antagonistas de GDF3. Un antagonista de los anteriores puede ser un anticuerpo u otra proteína que se enlaza específicamente con ese objetivo y lo inhibe (por ejemplo, un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal, o un propéptido en el caso de miostatina y GDF3). Un antagonista de los anteriores puede ser un compuesto, como un compuesto basado en ácidos nucleicos (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido o ARNi) que inhibe la expresión de ActRIIB o del ligando. Un paciente que sea tratado con un compuesto de este orden puede ser alguien que sufra de alguno de los trastornos que se describen en el presente, por ejemplo, un trastorno metabólico (por ejemplo, obesidad, diabetes, síndrome metabólico, dislipidemia o lipodistrofia) o un trastorno muscular asociado con un trastorno metabólico (por ejemplo, ciertas instancias de sarcopenia). La administración del compuesto puede promover la expresión de UCP-I en adipocitos del paciente bajo tratamiento, opcionalmente en el tejido adiposo blanco.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

La Figura 1 muestra el efecto del tratamiento de ActRIIB(20-134)-hFc durante 60 días en los niveles de mRNA de la proteína desacopladora 1 (UCPI) en la almohadilla de grasa epididimaria de ratones machos que han sido alimentados con una dieta rica en grasas. Los datos proporcionados por la RT-PCR (en unidades relativas, RU) son medias $\pm$

SEM; *, $p < 0.05$ en comparación con el vehículo. El ActRIIB(20-134)-hFc produjo un incremento de mRNA nueve veces mayor codificando este marcador selectivo para la grasa marrón, indicando así una sobreexpresión de la capacidad termogénica de los adipocitos marrón distribuidos difusamente en el depósito de grasa blanca.

La Figura 2 muestra cambios histológicos termogénicos en el tejido adiposo blanco epididimario inducidos por el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días en ratones alimentados con una dieta rica en grasa. Todas las imágenes se muestran con la misma ampliación. La tinción de hematoxilina y de eosina (H&E) indica la habilidad de ActRIIB(25-131)-hFc para reducir el tamaño de las gotas de lípidos e inducir conglomerados de adipocitos multiloculares (flechas) característicos de la grasa marrón. La inmunotinción de las secciones no adyacentes revela una inducción citoplasmática generalizada de UCPI (fluorescencia verde) en adipocitos multiloculares y uniloculares.

La Figura 3 muestra el efecto del tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días en los niveles de mRNA de UPC1 en la grasa blanca epididimaria de ratones que han sido alimentados con una dieta rica en grasas. Los datos proporcionados por la RT-PCR (en unidades relativas, RU) son medias $\pm$ SEM; $n = 6-7$ por grupo *, $p < 0.05$ en comparación con el vehículo. El ActRIIB(20-134)-hFc produjo un incremento de mRNA sesenta veces mayor codificando este marcador selectivo para la grasa marrón, indicando así un aumento de la capacidad termogénica en este depósito de grasa blanca.

La Figura 4 muestra los niveles de mRNA que codifica el miembro de la familia de las sirtuínas SIRT-1 (regulador de la información silenciosa, homólogo 1) en la grasa blanca epididimaria de ratones como una función de la dieta y con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Los datos proporcionados por la RT-PCR (en unidades relativas, RU) son medias $\pm$ SEM; $n = 7$ por grupo *, $p < 0.05$; NS = no significativo. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el ActRIIB(20-131)-hFc aumentó los niveles de mRNA de SIRT-1 en más del 70%, llevándolos a niveles que no eran significativamente diferentes de los que mostraban los ratones alimentados con una dieta estándar.

La Figura 5 muestra los niveles de mRNA que codifica el PGC-1 α (co-activador 1 α del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas) en la grasa blanca epididimaria de ratones como una función de la dieta y con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Los datos proporcionados por la RT-PCR (en unidades relativas, RU) son medias $\pm$ SEM; n = 6-7 por grupo; ***, p < 0.001. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el ActRIIB(20-131)-hFc aumentó los niveles de mRNA de PGC-1 α en más del 250%, llevándolos a niveles que no eran significativamente diferentes de los que mostraban los ratones alimentados con una dieta estándar.

La Figura 6 muestra los niveles de mRNA que codifican Foxo-1 (proteína O subfamilia 1 que contiene una caja forkhead) en la grasa blanca epididimaria de ratones como una función de la dieta y con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Los datos proporcionados por la RT-PCR (en unidades relativas, RU) son medias $\pm$ SEM; n = 7 por grupo; **, p < 0.001. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el ActRIIB(20-131)-hFc aumentó los niveles de mRNA de Foxo-1 en más del 90%, llevándolos a niveles que no eran significativamente diferentes de los que mostraban los ratones alimentados con una dieta estándar.

La Figura 7 muestra los niveles de mRNA de la adiponectina en la grasa blanca epididimaria de ratones como una función de la dieta y con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Los datos proporcionados por la RT-PCR (en unidades relativas, RU) son medias $\pm$ SEM; n = 7 por grupo; *, p < 0.05. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el ActRIIB(20-131)-hFc aumentó los niveles de mRNA de la adiponectina en más del 60%, contribuyendo así a concentraciones elevadas de adiponectina circulante en estos ratones.

La Figura 8 muestra los niveles séricos de la adiponectina en ratones como una función de la dieta y con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Las mediciones ELISA detectan todas las formas iso-oligoméricas principales (adiponectina total) y los datos proporcionados son medias $\pm$ SEM; n = 7-8 por grupo; **, p < 0.01. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el ActRIIB(20-131)-hFc aumentó los

niveles de adiponectina circulante en más de un 75% con lo cual sobrepasó los que presentan los controles de dieta estándar.

La Figura 9 muestra las concentraciones séricas de insulina en ratones como una función de la dieta y con el tratamiento de con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Los datos proporcionados son medias $\pm$ SEM; $n = 7-8$ por grupo; **, $p < 0.01$. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el ActRIIB(20-131)-hFc normalizó las concentraciones de insulina a niveles observados en controles de dieta estándar.

La Figura 10 muestra fotografías de pares bilaterales de depósitos interescapulares de grasa marrón como una función de la dieta y con el tratamiento de con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc durante 60 días. Una dieta rica en grasas aumentó el tamaño y aclaró el color de los depósitos, mientras que el tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc revirtió estos cambios en gran medida.

La Figura 11 ilustra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc durante 60 días en la masa de grasa marrón interescapular en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Los datos proporcionados son medias $\pm$ SEM para los depósitos izquierdos y derechos combinados; ***, $p < 0.001$. El ActRIIB(25-131)-mFc revirtió el efecto de una dieta rica en grasas en la masa de este depósito de grasa marrón.

La Figura 12 ilustra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc durante 60 días en la densidad de grasa marrón interescapular en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, tal como se establece por medio de una tomografía micro-computarizada (microTC). Los datos (medias $\pm$ SEM) se expresan en unidades estandarizadas con base en un valor positivo para el mineral óseo hidroxapatito (HA) y un valor de cero para el agua; por lo tanto, los valores para la grasa son negativos, en donde los valores para la grasa blanca se ubican típicamente cerca de -120. **, $p < 0.01$. El ActRIIB(25-131)-mFc revirtió completamente el efecto de una dieta rica en grasas en la densidad de este depósito de grasa marrón.

La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos completa de ActRIIB(25-131)-hFc (SEQ IDNO: 14). La secuencia líder de TPA (residuos 1-22) y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos nativos 25-131) aparecen subrayados. El glutamato que en la secuenciación se reveló como un aminoácido N-terminal de la proteína de fusión madura aparece resaltado.

La Figura 14 muestra una secuencia nucleótida codificando ActRIIB(25-131)-hFc (la hebra de codificación, SEQ ID NO: 15, aparece en la parte superior y el complemento, SEQ ID NO: 16, aparece en la parte inferior 3'-5'). Las secuencias codificando la secuencia líder de TPA (nucleótidos 73-396) aparecen subrayadas. También se muestra la secuencia de aminoácidos de ActRIIB(25-131).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Resumen

Las células grasas de los mamíferos se pueden clasificar como adipocitos blancos que almacenan energía o adipocitos marrón que disipan energía. Se considera que en gran medida la proteína desacopladora 1 (UCP1), la cual convierte la energía bioquímica en calor al desacoplar la producción de ATP del gradiente de protones mitocondrial, es el marcador funcional definitivo de los adipocitos marrón. En adelante, los adipocitos que expresan UCP1 serán denominados “adipocitos termogénicos”. La ablación genética del tejido adiposo marrón en ratones produce obesidad severa (Lowell et al., 1993, Nature 366:740-742) y la ablación selectiva de UCP1 impide las respuestas termogénica y anti-obesidad a la estimulación β 3-adrenérgica en ratones (Inokuma et al., 2006, Am J Physiol Endocrinol Metab 290 :E 1014-E 1021), lo cual confirma que UCP1 es una molécula con una función crítica en la regulación del gasto energético y la adiposidad (Kozak et al., 2008, Int J Obes 32:S32-S38).

En mamíferos, desde el ratón hasta los humanos, los adipocitos marrón se presentan en depósitos específicos de tejido adiposo marrón que son más prominentes en los recién nacidos, en consonancia con los desafíos térmicos que confronta la supervivencia a esa

edad. En hallazgos recientes se ha observado que estos depósitos de grasa marrón mantienen su capacidad termogénica en la edad adulta en los humanos (Nedergaard et al., 2007, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-E452; van Marken Lichtenbelt et al., 2009, *N Engl J Med* 360:1500-1508; Cypess et al., 2009, *N Engl J Med* 360:1509-1517), lo cual indica que es posible que ese tejido podría ser activado exógenamente para obtener un beneficio terapéutico. Curiosamente, también se presenta transitoriamente un número considerable de adipocitos marrón dentro de algunos depósitos de grasa "blanca" durante el periodo temprano de desarrollo postnatal (Xue et al., 2007, *J Lipid Res* 48:41-51) y puede reaparecer en depósitos de grasa blanca bajo ciertas condiciones en la edad adulta (Cousin et al., 1992, *J Cell Sci* 103:931-942). Incluso en los seres humanos, la limitada evidencia con la que se cuenta sugiere que los adipocitos marrón son inducibles en depósitos de grasa blanca durante la adultez (Lean et al, 1986, *Int J Obes* 10:219-227). Por lo tanto, existe también la posibilidad de inducir adipocitos termogénicos "difusos" en depósitos tradicionales de grasa blanca para obtener beneficios terapéuticos. De hecho, los depósitos tradicionales de tejido adiposo blanco despliegan un grado de remodelamiento celular o plasticidad fenotípica, que no se observa en depósitos específicos de grasa marrón (Prunet-Marcassus et al., 2006, *Exp Cell Res* 312:727-736).

Tal como se describe en los Ejemplos, se puede usar una proteína de fusión ActRIIB para aumentar la señalización de UCP1 en depósitos de grasa de ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Por lo tanto, se pueden usar agentes derivados de ActRIIB y otros compuestos que inhiben la señalización mediada por ActRIIB para aumentar el número y/o la actividad de adipocitos termogénicos. Entre los ligandos que se enlazan a ActRIIB que están implicados en la regulación de los adipocitos termogénicos se cuentan las activinas (por ejemplo, activina A, activina B, activina C y activina E), miostatina (es decir, GDF-8), GDF-3, GDF-11 y Nodal. En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a polipéptidos de ActRIIB. Tal como se usa en el presente, el término "ActRIIB" se refiere a la familia de proteínas receptoras de activina tipo IIB (ActRIIB) y proteínas relacionadas con ActRIIB, derivadas de cualquier especie. Los miembros de la familia de ActRIIB son por lo general todas proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de

enlazamiento del ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad predicha de serina/treonina quinasa. El precursor humano de ActRIIB tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en donde el péptido señal aparece subrayado, el dominio extracelular en negrilla y los sitios de potencial glicosilación ligada a N en bastardilla y subrayada (SEQ ID NO: 2) (NM OOI 106, 512 aa) [NdeT: En un pequeño cuadro en el original]

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERT***NQSGLERCEGEQDKRLH***
CYASWR***SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL***
PEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPP
PPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHE
NLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDV
PWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPPGKPPGDTHGQVGTRRYMA
PEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQ
EWVHKMKMRPTIKDHWLKHPLGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

La anterior secuencia silvestre, incluido el líder nativo, se usa a lo largo de esta divulgación como la secuencia de base para numerar los aminoácidos de cualquiera de los varios truncamientos, formas maduras y variantes de ActRIIB. El término “polipéptido de ActRIIB” se usa para referirse a los polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de un miembro de la familia de ActRIIB que se presenta de forma natural, lo mismo que a variantes de los mismos (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retengan una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia que sea por lo menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIB, y preferiblemente por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o una identidad mayor.

En un modo de realización específico, la invención se refiere a polipéptido soluble ActRIIB. Tal como se describe en el presente, el término “polipéptido soluble ActRIIB” se refiere por lo general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína de ActRIIB. El término “polipéptido soluble ActRIIB”, tal como se usa en el

21

presente, incluye cualquier dominio extracelular de una proteína de ActRIIB que se presenta de forma natural, así como cualquier variante de los mismos (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retengan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína de ActRIIB se une a un ligando y es por lo general soluble. El siguiente es un ejemplo de un polipéptido soluble ActRIIB (SEQ ID NO: 1) (116 aa).

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT

Otros ejemplos de polipéptidos solubles ActRIIB comprenden una secuencia de señales además de un dominio extracelular de una proteína de ActRIIB (ver Ejemplo 1). La secuencia de señales puede ser una secuencia de señales nativas de un ActRIIB o una secuencia de señales de otra proteína, tal como una secuencia de señales de un activador tisular del plasminógeno (TPA) o una secuencia de señales de melitina de abeja (HBM).

Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como los receptores de tipo II para las activinas (Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al, 1992, Cell 68: 97-108) así como una variedad de otros BMP y GDF. Además de las activinas, el ActRIIA y ActRIIB puede interactuar bioquímicamente con otras familias de proteínas relacionada con los TGF- β , incluyendo 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). En ciertos modos de realización, la presente invención se relaciona con un ligando antagonizador de receptores ActRIIB (denominado también como ligando de ActRIIB) con un polipéptido sujeto ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido soluble ActRIIB). Así, los compuestos y métodos de esta invención sirven para tratar trastornos asociados con una actividad anormal de uno o más ligandos de receptores ActRIIB. Entre los ejemplos de ligandos de ActRIIB se cuentan algunos miembros de la familia de los TGF- β , tales como la activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C y activina E), GDF3, Nodal, GDF8 y GDF11.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos y pertenecen a la superfamilia de los TGF-beta. Hay tres activinas (A, B y AB) que son homo/hétero-dímeros de dos subunidades β ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$) estrechamente relacionadas. En la superfamilia de los TGF-beta, las activinas son factores especiales y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células ováricas y placentarias, ayudan a la supervivencia de las células neuronales, influyen la progresión del ciclo celular bien sea positiva o negativamente según el tipo de célula e inducen diferenciación mesodérmica por lo menos en los embriones de anfibios (DePaolo et al, 1991, Proc SocEp Biol Med. 198:500-512; Dyson et al, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Más aún, se ha establecido que el factor de diferenciación eritroide (EDF) identificado en las células humanas estimuladas de la leucemia monocítica es idéntico a la activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha propuesto que la activina A actúa como un regulador natural de la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por el heterodímero relacionado, inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) de la glándula pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de la FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y síntesis de la FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina son la folistatina (FS), la proteína relacionada a la folistatina (FSRP), α 2-macroglobulina, Cerberus y endogлина, que se describen más adelante.

La proteína morfogénica ósea 7 (BMP7), también llamada la proteína osteogénica 1 (OP-1), es conocida por inducir la formación de cartílagos y huesos. Además, la BMP7 regula una gran variedad de procesos fisiológicos. Especialmente, la BMP7 ha sido identificada recientemente como un promotor clave de la diferenciación del adipocito marrón (Tseng et al., 2008, Nature 454:1000-1004). En este estudio, la ablación genética de BMP7 produjo una escasez de grasa marrón y prácticamente carencia absoluta de UCP1 en embriones murinos. Más aún, la sobreexpresión de BMP7 en ratones por la administración de adenovirus aumentó la masa de grasa marrón y gasto energético. Por lo tanto, la literatura parece indicar que no se puede esperar que un antagonista de BMP7 tal como un

polipéptido ActRIIB o un anticuerpo anti-ActRIIB promueve la expresión de UCP1, la formación de adipocitos marrón y/o actividad de adipocitos marrón. Como la activina, la BMP7 se une a los receptores tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, la BMP7 y la activina reclutan un tipo específico de receptores tipo I hacia los complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor de tipo I de la BMP7 que se observó fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). La BMP7 y la activina produjeron respuestas biológicas específicas y activaron diferentes rutas de Smad (Macias-Silva et al., 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

El factor de crecimiento y diferenciación-3 (GDF3) desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario y también ha sido implicado en la adipogénesis durante la adultez. En breve, la expresión de GDF3 en el tejido adiposo blanco se correlaciona con la masa corporal u obesidad (Weisberg et al., 2003, J Clin Invest 112:1796-1808), y la sobreexpresión de GDF3 exagera el aumento de adiposidad observado bajo condiciones de dieta rica en grasas en ratones de tipo silvestre (Wang et al., 2004, Biochem Biophys Res Commun 321 :1024-1031). De manera notable, los ratones con ablación genética de GDF3 son saludables y básicamente normales cuando se les mantiene con una dieta y se les protege contra la obesidad, pero presentan un índice metabólico basal aumentado cuando se les mantiene con una dieta rica en grasas (Shen et al., 2009, Mol Endocrinol 23:113-123). Tomados en conjunto, estos hallazgos implican a GDF3 de manera específica en la obesidad producida por la dieta y en términos más generales en la regulación de la adiposidad.

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y la formación mesodérmica y endodérmica, así como en la organización subsecuente de las estructuras axiales, tal como el corazón y el estómago, en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en el desarrollo de los embriones vertebrados contribuye predominantemente a las estructuras axiales del notocordio y la placa y precordial mientras que recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Las proteínas Nodal parece señalar a través de receptores de tipo I y de tipo II así como de efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. En estudios recientes se encuentra sustento a la idea de

que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para las proteínas Nodal (Sakuma et al., *Genes Cells*. 2002, 7:401-12). Se ha sugerido que los ligandos de las Nodal interactúan con sus co-factores (por ejemplo, cripto) para activar los receptores de tipo I y de tipo II de la activina, los cuales fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos eventos que son fundamentales para el desarrollo temprano del embrión vertebrado, incluida la formación mesodérmica, la formación del patrón anterior y la especificación axial izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización Nodal activa pAR3-Lux, un reportero de luciferasa que ya se ha demostrado que responde específicamente a la activina y a los TGF-beta. Sin embargo, la proteína Nodal no está en capacidad de inducir pTlx2-Lux, un reportero que responde específicamente a proteínas morfogénicas óseas. Existen resultados recientes que suministran evidencia bioquímica directa de que la señalización de las proteínas Nodal está mediada por Smads de la ruta de activina- TGF-beta, Smad 2 y Smad 3. Hay evidencia además de que se requiere la proteína extracelular cripto para la señalización de la proteína Nodal, lo cual la diferencia de la señalización de la activina o de los TGF-beta.

El factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF8) se conoce también como miostatina. El GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. El GDF8 se expresa altamente en el músculo esquelético en desarrollo y en el de adultos. La mutación nula de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una hipertrofia y una hiperplasia marcadas del músculo esquelético (McPherron et al., *Nature*, 1997, 387:83-90). Se han observado aumentos similares en la masa muscular esquelética en mutaciones de GDF8 que se han presentado de manera natural en el ganado (Ashmore et al., 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci*, 1994, 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; y Kambadur et al., *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) y, notablemente, en humanos (Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004;350:2682-8). Se ha observado también en estudios que el desgaste muscular asociado con VIH en humanos se manifiesta acompañado de aumentos en la expresión de la proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS*, 1998, 95:14938-43). Además, el GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas de los músculos (por ejemplo, la creatina quinasa) y

modular la proliferación de células mioblásticas (WO 00/43781). El propéptido de GDF8 puede unirse de manera no covalente a un dímero del dominio GDF8 maduro desactivando su actividad biológica (Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; y Brown et al. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 u otras proteínas relacionadas estructuralmente y que inhiben su actividad biológica son folistatina y, potencialmente, proteínas relacionadas a la folistatina (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

El factor de crecimiento y diferenciación-11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). El GDF11 se expresa en el brote caudal, brote de los miembros, arcos maxilar y mandibular y los ganglios espinales durante el desarrollo en ratones (Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). El GDF11 desempeña una función especial en la formación tanto del tejido mesodérmico como del nervioso (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208:222-32). Se ha comprobado que el GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de las extremidades en los polluelos (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229:407-20). La expresión de GDF11 en el músculo también apunta a su función en la regulación del crecimiento muscular de manera similar a la de GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro indica que GDF11 puede también realizar actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Resulta interesante que se haya comprobado que el GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu et al., 2003, Neuron. 37: 197-207). Por lo tanto, es probable que GDF11 tenga aplicaciones in vitro y en vivo para el tratamiento de enfermedades tales como trastornos musculares y trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere al uso de ciertos polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos solubles ActRIIB) para antagonizar la señalización de los ligandos de ActRIIB en general, en cualquier proceso relacionado con la actividad de ActRIIB. Alternativamente, los polipéptidos ActRIIB de la invención pueden antagonizar uno o más ligandos de los receptores ActRIIB, como la activina (por ejemplo, activina A,

activina B, activina C y activina E), GDF3, Nodal, GDF8 y GDF11, y puede por lo tanto ser útil en el tratamiento de más trastornos.

Por lo tanto, la presente divulgación contempla el uso de polipéptidos ActRIIB y antagonistas de ActRIIB o ligandos de ActRIIB en el tratamiento o la prevención de trastornos o condiciones que se encuentran relacionadas con las actividades de adipocitos termogénicos. Los ActRIIB o los ligandos de ActRIIB se encuentran involucrados en la regulación de muchos procesos biológicos de vital importancia. Los ejemplos de trastornos o condiciones metabólicas incluyen, pero no se limitan a, el síndrome metabólico (también conocido como síndrome X), diabetes, intolerancia a la glucosa, glucosa en ayunas alterada, concentraciones de insulina plasmática elevadas y resistencia a la insulina, dislipidemias, hiperlipidemia, ingesta excesiva y bulimia, cáncer de colon, próstata, seno, endometrio y riñón, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño, colelitiasis, cálculos de la vesícula biliar, hipertensión, trastornos cardíacos, ritmo cardíaco anormal y arritmias, infarto del miocardio, insuficiencia cardíaca, cardiopatía coronaria, arteriopatía coronaria, angina pectoris, muerte súbita, trastorno ovárico poliquístico, craneofaringioma, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Frohlich, deficiencia de la hormona de crecimiento, talla baja de variante normal, síndrome de Turner y otras condiciones patológicas que presente una actividad metabólica reducida o una disminución en el gasto de energía en estado de reposo como porcentaje del total de la masa libre de grasa, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda infantil. Otros ejemplos son disfunciones sexuales y reproductivas (como por ejemplo, infertilidad), hipogonadismo en hombres e hirsutismo en mujeres, trastornos de la motilidad gastrointestinal (tal como el reflujo gastroesofágico vinculado con la obesidad), trastornos respiratorios (como el síndrome de obesidad e hipoventilación o síndrome de Pickwick), trastornos cardiovasculares, infarto cerebral, trombosis cerebral, accidente isquémico transitorio, inflamación (como por ejemplo inflamación sistémica del sistema circulatorio), arteriosclerosis, hipercolesterolemia, acidemia hiperúrica, esteatosis hepática, gota, trastornos de la vesícula biliar, trastornos ortopédicos y dolor lumbar. Estos trastornos y condiciones se discuten más adelante en la sección de "Usos terapéuticos a manera de ejemplo".

En general, los términos que se emplean en esta especificación se usan con el significado común que tienen en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se utiliza cada término. Más adelante o en otros momentos de la especificación se discuten ciertos términos con el fin de suministrar una guía adicional al especialista en la descripción de las composiciones y los métodos de la invención y en cómo producirlos y usarlos. El alcance o significado del uso de cualquier término se hará evidente en el contexto específico en que se utilice ese término.

“Cerca de” y “aproximadamente” significan siempre un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error se ubican en un 20 por ciento (%), preferiblemente en un 10%, y más preferiblemente aún en un 5% de un valor o de un rango de valores determinado.

Alternativamente, y en especial en sistemas biológicos, los términos “cerca de” y “aproximadamente” pueden referirse a valores medios que se ubican dentro de un orden de magnitud, preferiblemente 5 veces y más preferiblemente aún 2 veces un valor determinado. Las cantidades numéricas que se suministran en el presente son aproximadas, salvo que se indique lo contrario, lo cual significa que se entiende tácitamente el término “cerca de” o “aproximadamente” cuando no se enuncia explícitamente.

Los métodos de la invención pueden comprender pasos de comparación de secuencias, incluyendo la comparación de secuencias de tipo silvestre con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones típicamente comprenden alineaciones de secuencias de polímeros, como por ejemplo, el uso de programas y/o algoritmos de alineación de secuencias ampliamente conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, para nombrar algunas). El experto puede apreciar inmediatamente que, en dichas alineaciones, en donde la mutación contiene una inserción o una eliminación de residuos, la alineación de la secuencia introduce una “brecha” (que suele representarse con un guión largo o una “A”) en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

El término “diabetes”, tal como se usa en el presente, se refiere a la diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID, conocida también como diabetes de tipo II). La diabetes de tipo I, o diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID), es el resultado de una deficiencia absoluta de insulina, la hormona que regula el uso de la glucosa. La diabetes de tipo II, es decir, diabetes mellitus no insulino-dependiente, se presenta con frecuencia a causa de niveles normales o incluso elevados de insulina y parece ser causada por la inhabilidad de los tejidos para responder adecuadamente a la insulina. La mayoría de los diabéticos con tipo II son también obesos.

“Homólogo”, en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un “origen evolucionario común”, incluyendo proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como a proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología secuencial, tal como se refleja en la similitud de sus secuencias, bien sea en términos de identidad porcentual o por la presencia de residuos o motivos específicos y de posiciones conservadas.

La “obesidad” es una condición en la que hay exceso de grasa corporal. La definición operativa de obesidad está basada en el índice de masa corporal (IMC), calculada como el peso corporal en kilos dividido por la estatura en metros cuadrados (kg/m^2). La “obesidad” se refiere a la condición que haya sido diagnosticada como tal por un médico. Un sistema estándar de medición se describe de la siguiente manera para pacientes de ascendencia europea, africana, indígena o hindú y se usa un sistema diferente para los pacientes asiáticos. Según este sistema, la obesidad se define como una condición en un paciente que en todos los demás aspectos es saludable pero tiene un IMC igual o mayor a 30 kg/m^2 o una condición en la que un sujeto con por lo menos una co-morbilidad tiene un IMC mayor o igual a 27 kg/m^2 .

El término “similitud en la secuencia” en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, independientemente de si comparten un origen evolucionario común.

Sin embargo, en el uso corriente y en la aplicación instantánea, el término “homólogo”, cuando se encuentra modificado por un adverbio tal como “altamente”, puede referirse a una similitud en la secuencia, independientemente de si comparten un origen evolucionario común.

2. Polipéptidos ActRIIB

En ciertos aspectos, esta invención se relaciona con variantes del polipéptido ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos solubles ActRIIB). Alternativamente, los fragmentos, las variantes funcionales y las formas modificadas tienen actividades similares o idénticas de sus polipéptidos ActRIIB de tipo silvestre correspondientes. Por ejemplo, una variante ActRIIB de la invención puede unirse a un ligando de ActRIIB e inhibir su función (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina E GDF3, Nodal, GDF8 o GDF11). Alternativamente, un polipéptido ActRIIB modula los tejidos de crecimiento tales como grasa, músculo, huesos o cartílago. Algunos ejemplos de ActRIIB son el precursor del polipéptido humano ActRIIB (SEQ ID NO: 2), y polipéptidos solubles ActRIIB humanos (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1, 5, 6, 12, 14 y 17).

Esta divulgación identifica porciones y variantes de ActRIIB funcionalmente activas. Los solicitantes han comprobado que una proteína de fusión Fc con la secuencia divulgada por Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15;83(8):2163-70), que tiene una Alanina en la posición que corresponde al aminoácido 64 de SEQ ID NO: 2 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por la activina y el GDF-11. En contraste, la misma proteína de fusión Fc con una Arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y el GDF-11 en el rango que va de nanomolar bajo a picomolar alto. Por lo tanto, se usa una secuencia con un R64 como la secuencia de referencia de tipo silvestre para el ActRIIB humano en esta divulgación.

Attisano et al. (Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108) demostraron que una eliminación del nudo de prolina en el C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor por la activina. Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contenga aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO:2, “ActRIIB(20-119)-Fc” tiene una capacidad de enlazamiento

reducida al GDF-11 y la activina en contraste con una ActRIIB(20-134)-Fc, que incluye la región del nudo de prolina y el dominio yuxta-membrana completo. Sin embargo, una proteína ActRIIB(20-129)-Fc retiene una actividad similar si bien algo reducida en relación con el tipo silvestre, aun cuando haya disrupción de la región del nudo de prolina. Por lo tanto, se espera que todos los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 sean activos, aun cuando los constructos que se detienen en 134 o 133 pueden ser los más activos. De manera similar, no se espera que las mutaciones de cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de enlazamiento del ligando por márgenes muy amplios. Como apoyo a esta hipótesis, las mutaciones de P129 y P130 no reducen de manera sustancial el enlazamiento del ligando. Por lo tanto, una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (la cisteína final); sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan un reducido enlazamiento del ligando. El aminoácido 119 no se conserva bien y por lo tanto se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o después retienen su actividad de enlazamiento del ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de enlazamiento intermedia. Cualquiera de estas formas puede ser usada, según sea el contexto clínico o experimental.

En el N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes retendrá la actividad de enlazamiento del ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación N-vinculada sin afectar sustancialmente el enlazamiento del ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre la escisión del péptido de señal y la región de enlazamiento cruzado de la cisteína, que corresponden a los aminoácidos 20-29, son bien toleradas. En particular, los constructos que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 retendrán la actividad y se espera que los constructos que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 también retengan la actividad.

En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:2, y los constructos pueden comenzar, por ejemplo, en un residuo que corresponda a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición que corresponda a los

aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición que va de 20-29 o de 21-29 y terminan en una posición que va de 119-134 o de 119-133 o de 129-134 o de 129-133. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición que va de 20-24 (o de 21-24, o de 22-25) y terminan en una posición que va de 109-134 (o de 109-133), de 119-134 (o de 119-133) o de 129-134 (o de 129-133). También se contemplan variantes dentro de estos rangos, especialmente aquellas que tenga una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% con la porción correspondiente de SEQ ID NO:2.

La divulgación incluye los resultados de una análisis de estructuras compuestas de ActRIIB que demuestra que el bolsillo de enlazamiento del ligando es definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 hasta T41, E47, E50, Q53 hasta K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 hasta N83, Y85, R87, A92 y E94 hasta F101. En estas posiciones se espera que se toleren las mutaciones convencionales, aun cuando la mutación K74A es bien tolerada, al igual que R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo cual indica que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en el ActRIIB bovino y K en el ActRIIB del género *Xenopus*, y por lo tanto los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general de una proteína variante de ActRIIB es una que comprende los aminoácidos 29-109, pero opcionalmente comenzando en una posición que oscila entre 20-24 o 22-25 y terminando en una posición que oscila entre 129-134, y comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios convencionales de aminoácidos en el bolsillo de enlazamiento del ligando y cero, una o más alteraciones no convencionales en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de enlazamiento del ligando. Una proteína de ese orden puede retener una identidad de secuencia de más del 80%, 90%, 95% o 99% con respecto a una secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:2. Los sitios por fuera del bolsillo de enlazamiento en los que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada incluyen los terminales amino y carboxi del dominio extracelular (como se indicó anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65 A) efectivamente mejora el enlazamiento de los ligandos en el fondo A64, y por lo tanto no se

espera que tenga un efecto nocivo sobre el enlazamiento del ligando en el fondo R64. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 en el fondo, con lo cual se demuestra que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A no es bien tolerado, un R64K es bien tolerado, y por lo tanto otro residuo básico, como H puede ser tolerado en la posición 64.

ActRIIB se conserva bien en casi todos los vertebrados, y largas porciones del dominio extracelular se conservan completamente. Muchos de los ligandos que se enlazan a ActRIIB también se conservan muy bien. En consecuencia, las comparaciones de las secuencias de ActRIIB de varios organismos vertebrados brindan luces acerca de los residuos que pueden ser alterados. Por lo tanto, una variante humana activa de ActRIIB puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de ActRIIB de otro vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al que se encuentra en la secuencia humana o de otro vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran esta forma de abordar la definición de una variante activa de ActRIIB. L46 es una valina en el ActRIIB de los *Xenopus*, y por lo tanto se puede alterar esta posición y se puede alterar opcionalmente a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o a un residuo no polar como A. E52 es K en los *Xenopus*, lo cual indica que este sitio posiblemente tolera una gran variedad de cambio, incluyendo residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es K en los *Xenopus*, lo cual indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, favoreciendo los residuos polares tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F 108 es Y en los *Xenopus*, y por lo tanto Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L, debería ser tolerado. E111 es K en los *Xenopus*, lo cual indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en los *Xenopus*, lo cual indica que los residuos básicos son tolerados en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 se conserva relativamente mal y aparece como P en los roedores y como V en los *Xenopus*, con lo cual básicamente cualquier aminoácido debería ser tolerado en esta posición.

Esta divulgación demuestra que la adición de un sitio de glicosilación N-vinculada adicional (N-X-S/T) aumenta la vida media en el suero de un proteína de fusión ActRIIB-

Fc en relación a una forma ActRIIB(R64)-Fc. Al introducir una asparagina en la posición 24 (constructo A24N), se crea una secuencia NXT que proporciona una vida media más larga. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aun cuando esta última puede no llegar a ser glicosilada eficientemente con R en la posición 64. Por lo general se pueden introducir secuencias N-X-S/T en posiciones por fuera del bolsillo de ligandos. Algunos de los sitios que se prestan especialmente para introducir secuencias N-X-S/T no endógenas son los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el vinculador entre la secuencia de ActRIIB y el Fc y otro componente de fusión. Un sitio de ese orden se puede introducir con un mínimo esfuerzo por medio de la introducción de N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistente, o por medio de la introducción de un S o T en una posición que le correspondería a un N preexistente. Así, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación N-vinculada son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinada con una alteración de N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S del cual se pueda esperar glicosilación puede ser alterado a un T sin que se cree un sitio inmunogénico, a causa de la proteína que se genera a partir de la glicosilación. De la misma manera, un T del cual se pueda esperar glicosilación puede ser alterado a un S. así, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. De la misma manera, en una variante A24N, se puede usar una alteración de S26T. En consecuencia, una variante de ActRIIB puede contener una o más secuencias adicionales de glicosilación N-vinculante no endógenas.

La posición L79 puede ser alterada para producir propiedades de enlazamiento de activina- miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce el enlazamiento de GDF-11 en mayor grado que el enlazamiento de activina. L79E o L79D retiene el enlazamiento de GDF-11. Es de anotar que las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida el enlazamiento de activina. En experimentos in vivo se ha observado que estos receptores no-activina retienen un habilidad significativa para aumentar la masa muscular pero muestran efectos reducidos en otros tejidos. Estos datos demuestran que es deseable y factible obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina.

Las variaciones que se han descrito se pueden combinar de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis que se describe en el presente indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que con frecuencia conviene conservar. Entre éstas se cuentan la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo, y particularmente triptofan), posición 37 (ácido, particularmente ácido aspártico o glutámico), posición 56 (aminoácido básico), posición 60 (aminoácido hidrófobo, especialmente fenilalanina o tirosina). Así, en cada una de las variantes que aquí se divulgan, la divulgación proporciona un marco de aminoácidos que pueden ser conservados. Otras posiciones que puede ser deseable que se conserven son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido), la posición 98 (polar o cargado, particularmente Y, E, D, R o K).

En un modo de realización, se pueden obtener fragmentos aislados de polipéptidos ActRIIB por medio del tamizaje recombinado de polipéptidos producidos a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NOs: 3 y 4). Además, los fragmentos pueden ser sintetizados químicamente empleando técnicas conocidas entre los expertos en el tema, tales como la química convencional de síntesis f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (recombinadamente o por síntesis química) y se pueden someter a prueba para identificar esos fragmentos de peptidil que puedan funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o de un ligando de ActRIIB.

En un modo de realización, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIB tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos un 75% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, 12, 14 y 17. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, 12, 14 y 17.

En un modo de realización, la presente invención contempla la producción de variantes funcionales por medio de la modificación de la estructura de polipéptido ActRIIB para fines tales como el mejoramiento de la eficacia o la estabilidad terapéutica (por ejemplo, ex vivo vida útil y resistencia a la degradación proteolítica en vivo). También se pueden producir polipéptidos ActRIIB por medio de, por ejemplo, sustitución, eliminación o adición de aminoácidos. Por ejemplo, está dentro de la lógica de los procedimientos que la sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartate por un glutamato, una treonina por una serina o una sustitución de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (como es el caso de las mutaciones convencionales) no tendrá un efecto importante en la actividad biológica de la molécula que resulta del proceso. Las sustituciones convencionales son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB produce como resultado un homólogo funcional evaluando la habilidad de la variante del polipéptido ActRIIB para generar una respuesta en células que sea similar a la del polipéptido ActRIIB de tipo silvestre, o para enlazarse a uno o más ligandos, tal como la activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C y activina E), Nodal, GDF3, GDF-11, o miostatina en un modo similar al del tipo silvestre.

En un modo de realización, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIB como para alterar la glicosilación del polipéptido. En la SEQ ID NO: 2 se ilustran ejemplos de sitios de glicosilación en polipéptidos ActRIIB. Se pueden seleccionar tales mutaciones con el fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación O-vinculada o N-vinculada. Por lo general los sitios de reconocimiento de glicosilación asparagina-vinculada comprenden una secuencia tripéptida, asparagina-X-treonina (en donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por las enzimas apropiadas de glicosilación celular. La alteración también se puede realizar por medio de la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo silvestre (para los sitios de glicosilación O-vinculada). Una variedad de sustituciones o

eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de la primera a tercera posiciones de un lugar de reconocimiento de la glicosilación (y/o la eliminación del aminoácido en la segunda posición) produce como resultado una no-glicosilación en la secuencia tripéptida modificada. Otra manera de aumentar el número de grupos funcionales de carbohidratos en un polipéptido ActRIIB es por medio del acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRIIB. Según sea el modo de acoplamiento que se utilice, el (las) azúcar(es) puede(n) adherirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilos libres, tales como los de la cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos como los de la fenilalanina, tirosina, o triptofan; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos aparecen descritos en WO 87/05330 publicada en Sep. 11, 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, y se incorporan a la presente por medio de la referencia. La eliminación de uno o más grupos funcionales de carbohidratos que se encuentran presentes en un polipéptido ActRIIB se puede realizar química y/o enzimáticamente. La deglicosilación química puede consistir en, por ejemplo, exposición del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometansulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar enlazante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que deja intacta la secuencia de aminoácidos. La deglicosilación química aparece descrita en más detalle en Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y en Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Se puede obtener la escisión enzimática de los grupos funcionales de carbohidrato de los polipéptidos ActRIIB por medio de una variedad de endo- y exo- glucosidasas tal como lo describen as Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Se puede ajustar la secuencia de un polipéptido ActRIIB, cuando se requiera, según sea el tipo de sistema de expresión que se utilice, pues las células de mamíferos, de levadura, de insectos o de plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB que se van a usar en humanos serán expresadas en una célula de mamífero que perita una correcta glicosilación, tal como las líneas celulares HEK293 o

CHO, aun cuando se espera que otras líneas celulares de expresión de mamíferos pueden también ser apropiadas.

Esta divulgación contempla además un método para generar variantes, especialmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido ActRIIB, incluyendo, opcionalmente, variantes truncadas; las agrupaciones de mutantes combinatorias son especialmente adecuadas para identificar las secuencia de variantes funcionales. La finalidad de tamizar esas bibliotecas combinatorias puede ser la de generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIB que tengan propiedades alteradas, tal como farmacocinética alterada o enlazamiento a ligando alterado. Más adelante se suministra una variedad de pruebas de tamizaje y tales pruebas se pueden emplear para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRIIB puede ser tamizada para establecer la habilidad de enlazarse a un polipéptido ActRIIB con el fin de evitar el enlazamiento de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB.

También se puede someter a prueba la actividad de un polipéptido ActRIIB o de sus variantes en ensayos celulares o en vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRIIB en la expresión de genes involucrados en la diferenciación o función de adipocitos (por ejemplo, UCP-1). Esto se puede realizar, según se requiera, en la presencia de una o más proteínas recombinantes de ligandos de ActRIIB (por ejemplo, GDF8), y se pueden transfectar las células para producir un polipéptido ActRIIB y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRIIB. De manera similar, un polipéptido ActRIIB puede ser administrado a un ratón u otro animal, y se puede evaluar una o más propiedades de los adipocitos, tal como la termogénesis de adipocitos marrón. Igualmente, se puede hacer una prueba de la actividad de un polipéptido ActRIIB o de sus variantes en células grasa, células musculares, células óseas y células neuronales para establecer el efecto en el crecimiento de estas células aplicando, por ejemplo, las pruebas que se describen más adelante. Tales pruebas son bien conocidas y son usadas rutinariamente por los expertos en el tema. Se puede utilizar un gen reportero que responda a SMAD en dichas líneas celulares para monitorear los efectos de la señalización corriente abajo

Se pueden generar variantes derivadas combinatoriamente que tengan una potencia selectiva con respecto a los polipéptidos ActRIIB que se presentan en la naturaleza. Tales proteínas variantes, cuando se expresan a partir de constructos recombinantes de ADN, pueden ser utilizadas en protocolos de terapia genética. Igualmente, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen vidas medias intracelulares radicalmente distintas a las del polipéptido ActRIIB de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse más estable o menos estable ante la degradación proteolítica u otros procesos que llevan a la destrucción o por lo menos a la inactivación de un polipéptido ActRIIB nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden ser utilizadas para alterar los niveles de polipéptido ActRIIB por medio de la modulación de la vida media de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una media vida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido ActRIIB recombinante dentro de la célula.

En un modo de realización, los polipéptidos ActRIIB de la invención pueden comprender asimismo modificaciones post-translacionales además de las que ya se encuentran presentes en los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Por consiguiente, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tal como polietilenglicoles, lípidos, poli o mono sacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos no aminoácidos en la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB pueden probarse de la misma manera que se describe aquí para otras variantes de polipéptidos ActRIIB. Cuando se produce un polipéptido ActRIIB en células por medio de la escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIB, puede ser necesario un procesamiento post-translacional para corregir el plegamiento y/o la función de la proteína. Las células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen cada una su propia maquinaria celular y mecanismos específicos para realizar tales actividades post-translationales y se pueden elegir para asegurara la modificación y el procesamiento correcto de los polipéptidos ActRIIB.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o las formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen por lo menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Algunos ejemplos ampliamente conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutathione S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadenas pesadas de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albumina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir la propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son especialmente útiles para aislar las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para efectos de la purificación de afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas de glutación, amilasa y níquel o cobalto. Muchas matrices de este tipo están disponibles en forma de un "kit", tal como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpressTM (Qiagen) útil con participantes en la fusión (HIS₆). A manera de ejemplo adicional, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de polipéptidos ActRIIB. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las varias proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como "etiquetas de epítipo", que suelen ser secuencias cortas de péptidos para los cuales hay un anticuerpo disponible. Ejemplos bien conocidos de etiquetas de epítipos para las que están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen etiquetas FLAG, de hemaglutinina del virus de la gripa (HA) y de c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el Factor Xa o Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y gracias a ellos libere las proteínas recombinantes que se generan. Las proteínas liberadas pueden luego separarse del dominio de fusión mediante una separación cromatográfica. En cierta realización preferida, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB en vivo (un dominio "estabilizador"). Se entiende por "estabilizador" cualquier cosa que aumente la vida media sérica, independientemente de si esto sucede porque hay una disminución de la destrucción, de la limpieza que produce el riñón o a causa de cualquier otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con una porción Fc

de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a un amplio rango de proteínas. Igualmente, las fusiones con albúmina sérica humana pueden otorgar propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como estimulación del crecimiento muscular).

Para usar un ejemplo específico, esta invención se refiere a una proteína de fusión como un antagonista GDF8 que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, GDF8-enlazante) fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEQ ID NO: 13).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWD (A) VSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK

Alternativamente, 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 tenga una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asp-265) presenta una habilidad reducida para enlazarse con el receptor Fcγ en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre. En otros casos, el dominio Fc mutante que tenga una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asn-434) tiene una habilidad aumentada de enlazarse con el receptor Fc asociado a un MHC clase I (FcRN) en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre.

Se entiende que se pueden distribuir diferentes elementos de las proteínas de fusión de orbicularis oculi tal que se corresponda con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede posicionarse C-terminal con respecto a un dominio heterólogo o, alternativamente, un dominio heterólogo puede posicionarse C-terminal con respecto a un polipéptido ActRIIB. El dominio del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no requieren ser adyacentes en una proteína de fusión y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos c-terminal o N-terminal adicionales a cualquiera de los dominios o entre los dominios.

En un modo de realización, los polipéptidos ActRIIB de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la vida media in vitro de los polipéptidos ActRIIB, mejoran la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (como, por ejemplo, las proteínas de fusión que comprende un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (como, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIB) y modificaciones de un grupo funcional de carbohidratos (como, por ejemplo, la eliminación de grupos funcionales de carbohidratos de un polipéptido ActRIIB). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio estabilizador tal como una molécula IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Tal como se usa en el presente, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, un dominio Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas tal como un grupo funcional de carbohidratos, o un polímero no proteináceo, tal como polietilén glicol.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIB, que se separan, o se encuentran de alguna otra manera libres, de otras proteínas.

En un modo de realización, los polipéptidos ActRIIB de la invención (modificados o no modificados) se pueden producir mediante una variedad de técnicas conocidos por aquellos versados en la materia. Por ejemplo, dichos polipéptidos ActRIIB pueden ser sintetizados utilizando técnicas estándar de química proteica como las que se describen en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Además, se puede obtener comercialmente sintetizadores automatizados de péptidos (por ejemplo, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, se pueden producir polipéptidos ActRIIB, fragmentos o variantes de los mismos recombinadamente utilizando varios sistemas de expresión (por ejemplo, E. coli,

células derivadas del ovario del hámster chino, células COS, baculovirus) como es bien conocido entre aquellos versados en la materia (ver también más adelante). En una realización adicional, se pueden producir los polipéptidos ActRIIB modificados o no modificados mediante la digestión de polipéptidos ActRIIB completos bien sea que se presenten así en la naturaleza o sean producidos recombinadamente mediante el uso, por ejemplo, de una proteasa, como tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsin, o la enzima convertidora de aminoácidos básicos pareados (PACE, por sus sigla en inglés). Se puede realizar un análisis computacional (utilizando software disponible comercialmente, como MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, se pueden producir estos polipéptidos ActRIIB de polipéptidos ActRIIB completos bien sea que se presenten así en la naturaleza o sean producidos recombinadamente utilizando técnicas ampliamente conocidas por aquellos versados en la materia, como la escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB

En ciertos aspectos, la invención se refiere a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIB (por ejemplo, polipéptidos solubles ActRIIB), incluidas cualquiera de las variantes que se divulgan en el presente. Por ejemplo, la siguiente secuencia codifica un precursor humano de polipéptido ActRIIB que se presenta en la naturaleza (SEQ ID NO: 4) (nucleótidos 5-1543 de NM_001106, 1539 bp):

```
atgacggcgccctgggtggccctgccctcctctggggatcgtgtggcccgctctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctacta
caacccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcct
ggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggcgtctggctagatgactcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgag
gagaacccccagggtactctgtctgtgaaggcaactctgcaacgagcgctcactcattgccagaggctgggggccccgaagtcacgtac
gagccacccccgacagccccaccctgctcacgggtctggcctactactgctgcccacggggcctttccctcatcgtcctgctggccttttgat
gtaccggcatcgcaagccccctacggcatgtggacatcatgaggaccctgggcctccaccaccatccccctggtgggctgaagccactgca
gctgctggagatcaaggctcgggggcgtttggctgtctggaaggccagctcatgaatgactttagctgtcaagatctccactccaggaca
agcagtcgtggcagagtgaacgggagatctcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcattgctccgagaagcgaggctcc
aacctgaagtagagctgtggctcatcacggccttcacgaagggtccctcacggattacctaagggaacatcatcacatggaacgaactgt
```

gtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctcatacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgccaca
 gggactttaaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcgatttgagccagggaacctcca
 ggggacaccacggacaggtaggcacgagacggtacatggctcctgaggtgctcgaggagccatcaacttcagagagatgccttctgcgca
 ttgacatgtatccatgggttggtgctgtggagctgtgtctcgtgcaaggctgcagacggaccctggatgagtacatgctgcccttgaggaa
 gagattggccagcacccttcgttgaggagctgcaggaggtgggtgggcacagaagatgaggccaccattaaagatcactggtgaaacaccc
 gggcctggccagcttctgtgacctcagaggagtgctggaccatgatgcagaggctcgttgcgcgggctgtgtggaggagcgggtgtccct
 gattcggagggtcggtcaacggcactacctcgactgtctcgttccctggtagacctgtcaccaatgtggacctgccccctaaagatcaagcatcta
 a

La siguientes secuencia codifica un polipéptido soluble ActRIIB (extracelular) humano (SEQ ID NO: 3) (348 bp).

tctggcggtgggaggtgagacacgggagtgcatctactacaacccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgtgc
 gaaggcgagcaggacaagcggctgactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggtagatg
 acttcaactgtacgataggcaggagtggtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgtctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgtt
 cactcattgccagaggctgggggcccgaagtcacgtacgagccacccccgacagcc cccacc

Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN p ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar en, por ejemplo, métodos para producir polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia genética).

En ciertos aspectos, se entiende que los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 3. Las secuencias de variantes de nucleótidos incluyen secuencias que se diferencian en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas; e incluirán por lo tanto secuencias de codificación que se diferencia de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación designada en SEQ ID NO: 4.

En un modo de realización, la invención e refiere a secuencias de ácidos nucleicos aislados o recombinantes que son idénticas en por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a SEQ ID NO: 3. Una persona versada en la materia reconoce las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a SEQ ID NO: 3; las variantes de SEQ ID NO: 3 también se encuentran dentro del alcance de esta invención. En otros modos de realización, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden ser aisladas,

recombinadas y/o fusionadas con una secuencia heteróloga de nucleótidos o en una biblioteca de ADN. Por ejemplo, la invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que son idénticas en por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a SEQ ID NO: 10 o 15.

En otros modos de realización, los ácidos nucleicos de la invención también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan bajo condiciones bajo rigurosas condiciones a una secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO:3, secuencias complementarias de SEQ ID NO: 3, o fragmentos de éstas. Tal como se ha anotado anteriormente, una persona versada en la materia comprenderá rápidamente que es posible variar las condiciones rigurosas apropiadas que promueven la hibridación de DNA. Por ejemplo, se puede realizar una hibridación a 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a cerca de 45° C, seguida de un lavado de 2.0 x SSC a 50° C. por ejemplo, se puede seleccionar la concentración de sal en el paso del lavado de una baja rigurosidad de cerca de 2.0 x SSC a 50° C a una alta rigurosidad de cerca de 2.0 x SSC a 50° C. Además, la temperatura en el paso del lavado se puede aumentar de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, cerca de 22° C, a condiciones de alta rigurosidad a cerca de 65° C. tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de la sal pueden mantenerse constantes mientras que se cambia la otra variable. En una realización, la invención se refiere a ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de .6 x SSC a temperatura ambiente seguida de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

También se encuentran dentro del alcance de esta invención ácidos nucleicos aislados que difieren de ácidos nucleicos tal como aparecen en SEQ ID NO: 3 debido a una degeneración en el código genético. Por ejemplo, si un número de aminoácidos son designados por más de una tríada. Codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) puede resultar en mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que en las células de mamíferos existan polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas sujeto.

Una persona versada en la materia reconocerá que entre individuos de una cierta especie se pueden presentar esas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta cerca de 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular debido a una variación alélica natural. Todas y cualquiera de las variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos que resultan de ellas se encuentran dentro del alcance de esta invención.

En un modo de realización, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden estar vinculados operacionalmente a una o más secuencias reguladoras de nucleótidos en un constructo de expresión. Las secuencias reguladoras de nucleótidos por lo general serán apropiadas para la célula anfitrión usada para la expresión. En la materia se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras para una variedad de células anfitrión. Típicamente, uno o más de dichos nucleótidos reguladores puede incluir, pero sin limitarse a, secuencias promotoras, líder o de señal, sitios de enlazamiento ribosómico, secuencias de inicio y termino de la transcripción, secuencias de inicio y término de la traducción y secuencias de enhancer (potenciador) o activador. La invención contempla promotores constitutivos o inducibles tal como se conocen en la materia. Los promotores pueden ser promotores que se presentan en la naturaleza o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede hallarse en una célula en un episoma, tal como un plásmida, o el constructo de expresión puede estar insertado en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable que permite la selección de células anfitrión transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la materia y varían según la célula anfitrión que se utilice.

En ciertos aspectos, de la invención, el ácido nucleico en cuestión es suministrado en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y vinculado operacionalmente a por lo menos una secuencia regulatoria. Las secuencias reguladoras son reconocidas por aquellos versados en la materia y se seleccionan para direccionar la expresión del polipéptido ActRIIB. En consecuencia, el término "secuencia regulatoria" incluye promotores, enhancers (potenciadores) y otros

elementos de control de la expresión. Ejemplos de secuencias reguladoras se encuentran descritos en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, en estos vectores se puede usar cualquiera de la gran variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se encuentra operativamente vinculada a ella para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Tales secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor tet, el promotor inmediato temprano del adenovirus o el citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es direccionada por la polimerasa T7 ARN, las principales regiones operadoras y promotoras de fago lambda, las regiones de control para la protección de cubierta fd, el promotor de 3-fosfoflicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de ácido fosfatasa, como por ejemplo Pho5, los promotores de factores de apareamiento-a de la levadura, el promotor polihédrico del sistema baculovirus y otras secuencias que se conocen para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de las mismas. Se debe tener en cuenta que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores de elección de la célula anfitrión a ser transformada y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Más aún, se deben tener en cuenta el número de copia del vector, la habilidad de controlar ese número de copia y la expresión de cualquier otra proteína codificada del vector, tal como los marcadores antibióticos.

Se puede producir un ácido nucléico recombinante de la invención mediante la ligación de un gen clonado, o de una porción del mismo, en un vector apropiado para la expresión bien sea en las células procariotas, las células eucariotas (de levadura, aviar, de insectos o mamíferos) o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluye plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, vectores adecuados incluyen plásmidos de los siguientes tipos: plásmidos pBR322-derivados, plásmidos pEMBL-derivados, plásmidos pEX-derivados, plásmidos pBTac-

derivados y plásmidos pUC-derivados para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen ambas secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias y una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tal como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a la droga en las células procariotas y eucariotas.

Alternativamente, se pueden usar derivados de virus tales como el virus de papiloma humano (BPV-I), o virus de Epstein-Barr (pHEBo, pREP-derivado y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Más adelante, en la descripción de los sistemas de administración de la terapia genética, se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión viral (incluida la retroviral). Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de los organismos anfitriones son bien conocidos entre aquellos versados en la materia. Para otros sistemas de expresión para las células procariotas y eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales ver *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) capítulos 16 y 17. En algunos modos de realización, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión baculovirus. Entre los ejemplos de estos sistemas de expresión baculovirus se cuentan vectores pVL-derivados (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores pAcUW-derivados (tal como pAcUW1) y vectores pBlueBac-derivados (tal como el pBlueBac III que contiene β -gal).

En una realización preferida, un vector será diseñado para la producción de los polipéptidos ActRIIB en células CHO, tal como el vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega,

Madison, Wise). Tal como se verá, los constructos de genes pueden ser usados para producir la expresión de los polipéptidos ActRIIB en células propagadas en cultivos, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para su purificación.

Esta invención también se refiere a una célula anfitrión transfectada con un gen recombinante incluyendo una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 4, 10, o 15) para uno o más de los polipéptidos ActRIIB. La célula anfitrión puede ser cualquier célula procariota y eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB de la invención puede expresarse en células bacterianas como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, usando un sistema de expresión baculovirus), levadura, o células de mamíferos. Aquellos versados en la materia conocen otras células anfitrión adecuadas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere además a métodos de producción de los polipéptidos ActRIIB en cuestión. Por ejemplo, una célula anfitrión transfectada con un vector de expresión codificando un polipéptido ActRIIB puede ser cultivada bajo condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB puede ser retenido citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células pueden ser cosechadas, lisadas y la proteína aislada. Un cultivo celular incluye células anfitrión, medios y otros subproductos. Hay varios medios apropiados para el cultivo de células ampliamente conocidos por aquellos versados en la materia. Los polipéptidos ActRIIB pueden aislarse del medio del cultivo celular, las células anfitrión, o ambos, usando técnicas conocidas por los versados en la materia para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación mediante inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares del polipéptido ActRIIB. En una realización preferida, el polipéptido ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

En otra realización, un gen de fusión codificando para una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de la poli-(His)/enteroquinasa en el N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación puede ser eliminada subsecuentemente mediante tratamiento con enteroquinasa para producir el polipéptido ActRIIB purificado (ver, por ejemplo, Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411 : 177; and Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas para producir genes de fusión son ampliamente conocidas. Básicamente, se unen varios fragmentos de ADN que codifican para diferentes secuencias de polipéptidos siguiendo técnicas convencionales, utilizando terminales con extremos romos o extremos cohesivos para la ligación, digestión con enzimas de restricción para brindar terminales adecuados, completar las terminaciones cohesivas según se requiera, aplicar un tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseadas y ligación enzimática. En otra realización, se puede sintetizar el gen de fusión mediante técnicas convencionales, incluidos los sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, se puede realizar una amplificación de los fragmentos de los genes mediante PCR, empleando cebadores de anclaje que producen proyecciones complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden ser luego recocidos para dar lugar a una secuencia de gen quimérico (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Anticuerpos y otros antagonistas

Otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos y otros antagonistas, incluyendo proteínas que se enlazan a objetivos que se divulgan en el presente y ácidos nucleicos que inhiben objetivos de expresión que se divulgan en el presente. Se puede usar un anticuerpo que reaccione específicamente con un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido soluble ActRIIB) y que se enlace competitivamente con el polipéptido ActRIIB como antagonista de las actividades del polipéptido ActRIIB. Por ejemplo, mediante el uso

de inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIB, se pueden producir anticuerpos anti-proteína/anti-péptido policlonales o monoclonales con protocolos estándar (ver, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Se puede inmunizar un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, con una forma inmunogénica de un polipéptido o de un ligando ActRIIB, con un fragmento antigénico que tenga capacidad de generar una respuesta anticuerpo, o con una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o a un péptido incluyen conjugación a las portadoras y otras técnicas ampliamente conocidas por los versados en la materia. Se puede administrar una porción inmunogénica de un polipéptido ActRIIB o de un ligando de ActRIIB en presencia de un adyuvante. Se puede monitorear el progreso de la inmunización mediante la detección de los títulos de anticuerpo en el plasma o el suero. Se pueden usar pruebas estándar ELISA u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de los anticuerpos.

Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido o un ligando ActRIIB, se pueden obtener sueros inmunológicos y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden cosechar células que producen anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y se pueden fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizantes, como por ejemplo células de mieloma, para producir células de hibridoma. Dichas técnicas son ampliamente conocidas por los versados en la materia, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridomas (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbar et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células hibridomas pueden ser tamizadas inmunoquímicamente para producir anticuerpos que reaccionen específicamente con un polipéptido ActRIIB y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprenda dichas células hibridomas.

El término “anticuerpo” tal como se utiliza en el presente incluye fragmentos de los mismos que reaccionan específicamente al polipéptido o ligando ActRIIB en cuestión. Los anticuerpos pueden ser fragmentados mediante técnicas convencionales y los fragmentos pueden ser tamizados para comprobar su utilidad de la misma manera que se ha descrito anteriormente para los anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos de F(ab)2 mediante el tratamiento de un anticuerpo con pepsina. El fragmento de F(ab)2 que se produce puede ser tratado para reducir los puentes disulfuro y así obtener fragmentos de Fab. Se considera que cualquier anticuerpo de la presente invención también incluye moléculas biespecíficas, monocatenarias y quiméricas y humanizadas que tengan afinidad con un polipéptido ActRIIB conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. En ciertos modos de realización preferidos, el anticuerpo comprende además una etiqueta anexa al mismo y que sea posible de detectar (por ejemplo, la etiqueta puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor enzimático).

En ciertos modos de realización preferidos, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal y en un modo de realización, la invención proporciona métodos para generar anticuerpos novedosos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se enlace específicamente con un polipéptido o un ligando ActRIIB puede consistir en administrarle a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprenda un polipéptido o un ligando ActRIIB que sea efectiva para estimular una respuesta inmune detectable, obtener del ratón células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) y fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y luego hacer una prueba a los hibridomas productores de anticuerpos con el fin de identificar el hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se enlace específicamente con el polipéptido o ligando ActRIIB en cuestión. Una vez se ha obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo de células, opcionalmente en condiciones de cultivo en los que las células derivadas del hibridoma produzcan el anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente con el polipéptido o ligando ActRIIB. El anticuerpo monoclonal se puede purificar a partir de ese cultivo celular.

Con el término “reacciona específicamente con” tal como se usa en referencia a un anticuerpo se quiere decir, tal como se entiende generalmente entre los versados en la materia, que el anticuerpo es suficientemente selectivo como para distinguir entre el antígeno que interesa (como sería un polipéptido ActRJIB) y otros antígenos que no son de interés pero para los cuales el anticuerpo es de utilidad y como mínimo que el anticuerpo es capaz de detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que utilizan el anticuerpo, tales como las aplicaciones terapéuticas, es deseable que tenga un grado más alto de especificidad enlazante. Los anticuerpos monoclonales suelen tener una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar efectivamente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que afecta la especificidad de una interacción entre anticuerpos y antígenos es la afinidad que tenga el anticuerpo por el antígeno. Aun cuando se puede obtener la especificidad deseada con un rango de afinidades diferentes, por lo general los anticuerpos deseados tendrán una afinidad (una constante de disociación) de cerca de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menor.

Además, las técnicas empleadas para tamizar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo que se obtiene. Por ejemplo, si un anticuerpo va a ser utilizado para enlazar un antígeno en solución, puede ser deseable probar el enlazamiento de la solución. Existe una variedad de técnicas diferentes para probar la interacción entre anticuerpos y antígenos con el fin de identificar los anticuerpos que sean especialmente deseables. Entre dichas técnicas se cuentan las mediciones ELISA, las pruebas de resonancia por plasmón de superficie (por ejemplo, el ensayo de enlazamiento de Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suecia), ensayos tipo “emparedado” (por ejemplo, el sistema paramagnético de separación de cuentas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunoblots, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a anticuerpos que se enlazan con un polipéptido soluble ActRJIB o ligando. Dichos anticuerpos pueden ser generados de la manera que se describió anteriormente, utilizando un polipéptido soluble ActRJIB o ligando

o un fragmento del mismo como antígeno. Los anticuerpos de este tipo se pueden usar para, por ejemplo, detectar polipéptidos ActRIIB en muestras biológicas y/o monitorear los niveles de un polipéptido soluble ActRIIB en un individuo. En ciertos casos, un anticuerpo que se enlaza específicamente a un polipéptido soluble ActRIIB o ligando puede ser empleado para modular la actividad de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando de ActRIIB, con lo cual se incrementan los adipocitos termogénicos.

Ciertos ligandos, como por ejemplo la miostatina y GDF3, pueden ser inhibidos utilizando un polipéptido que comprenda una porción enlazante del respectivo propéptido, o una variante del mismo. Dichos propéptidos se pueden preparar como proteínas de fusión, incluidas las proteínas de fusión Proteína de fusión Fc. En las solicitudes de patente WO 02/085306 y WO 06/002387 se divulgan ejemplos de propéptidos adecuados.

Adicionalmente, se pueden usar otras proteínas enlazantes, tales como las así llamadas “traps” (por ejemplo, folistatina, FLRG, FSTL, Cerberus y Coco) o receptores solubles de tipo I, como por ejemplo ALK-7. En las solicitudes de patente WO 05/115439, WO 08/109779, WO 08/067480, WO 07/109686, WO 05/100563 y WO 05/025601 se pueden encontrar ejemplos de dichos polipéptidos.

Se pueden usar ácidos nucleicos, tales como muestras anti-sentido o ARNi (que pueden incluir nucleótidos que se presentan naturalmente y otros que no se presentan naturalmente) para inhibir la expresión de ActRIIB o de cualquiera de los ligandos que se discuten en el presente.

5. Pruebas de tamizaje

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere al uso de los polipéptidos ActRIIB en cuestión (por ejemplo, polipéptidos solubles ActRIIB) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados a través de este proceso de tamizaje pueden ser puestos a prueba en tejidos como grasa, músculo, hueso, cartílago, y/o neuronas, para evaluar su habilidad de modular el crecimiento del tejido in vitro. Alternativamente, estos compuestos pueden ser

probados adicionalmente en modelos animales para evaluar su habilidad para modular el crecimiento del tejido en vivo.

Existen numerosos enfoques del proceso de tamizaje (screening) de agentes terapéuticos para la modulación del crecimiento de tejido mediante el direccionamiento hacia los polipéptidos ActRIIB. En un modo de realización, se puede llevar a cabo una prueba de tamizaje de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturben los efectos mediados por ActRIIB en el crecimiento de grasa, músculo, hueso, cartilago, y/o neuronas. En un modo de realización, la prueba es llevada a cabo para detectar e identificar compuestos que específicamente inhiban o reduzcan la unión de un polipéptido ActRIIB con su compañeros de enlace, como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, GDF3, Nodal, GDF8, o GDF11). Alternativamente, la prueba puede ser usada para identificar compuestos que eleven el enlace de un polipéptido ActRIIB a su proteína de enlace, como un ligando de ActRIIB. En una realización adicional, los compuestos pueden ser identificados por su habilidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Será suficiente una variedad de formatos de pruebas y, a la luz de esta divulgación, aquellos no descritos expresamente aquí serán de todas maneras comprendidos por cualquier persona versada en la materia. Como se describe aquí, los compuestos de prueba (agentes) de la invención pueden ser creados por cualquier método químico de combinatoria. Alternativamente, los compuestos del sujeto pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas en vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) a ser probados por su habilidad para actuar como moduladores de crecimiento de tejido pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levadura, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluyendo los peptidomiméticos), o producidos por recombinación. Los compuestos de prueba contemplados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas no peptidil, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas, y moléculas de ácido nucléico. En un modo de realización específico, el agente de la prueba es una pequeña molécula que tiene peso molecular de menos de alrededor de 2.000 daltons.

SS

Los compuestos de prueba de la invención pueden ser suministrados como entidades discretas y solas, o suministrados en bibliotecas de mayor complejidad, como las hechas por medio de química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haloalcanos, 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 una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las primeras fases del tamizaje. Alternativamente, los compuestos pueden ser alternativamente derivatizados con otros compuestos y tener grupos derivatizadores que faciliten el asilamiento de los compuestos. Ejemplos -no limitantes- de grupos derivatizadores son la biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticuladores foto-activables o cualquier combinación en su lugar.

En muchos programas de tamizaje de drogas que ponen a prueba bibliotecas de compuestos y extractos naturales, las pruebas de alto rendimiento son preferibles para maximizar el número de compuestos estudiados en un período dado de tiempo. Las pruebas que son llevadas a cabo en sistemas libres de células, como los que pueden ser obtenidos con proteínas purificadas o semi-purificadas, son usualmente preferidas como tamizajes “primarios”, en la medida en que pueden ser generadas para permitir un rápido desarrollo y relativamente fácil detección de una alteración en una diana molecular que esté mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba pueden ser generalmente ignorados en el sistema in vitro, estando el ensayo por el contrario enfocado principalmente en el efecto de la droga en la diana molecular, como puede estar manifiesto en una alteración de la afinidad de enlace entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de enlace (por ejemplo, un ligando ActRIIB).

A manera de ilustración, en un ejemplo de prueba de tamizaje de la presente invención, se pone en contacto el compuesto de interés con un polipéptido ActRIIB, aislado y purificado, que es ordinariamente capaz de enlace con un ligando de ActRIIB, como es apropiado para la intención de la prueba. Se añade después un compuesto que contiene un ligando de ActRIIB a la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB. La detección y

cuantificación de complejos de ActRIIB/ ligandos de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia que tenga un compuesto de inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de enlace. La eficacia del compuesto se puede medir generando curvas de dosis-respuesta, a partir de los datos obtenidos usando varias concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar una prueba de control para proporcionar una base de referencia para la comparación. Por ejemplo, en una prueba de control, se añade un ligando ActRIIB, aislado y purificado, a la composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y se cuantifica la formación de complejo de ActRIIB/ ligandos de ActRIIB en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, puede variar el orden en el que los reactantes pueden ser mezclados y que pueden ser mezclados simultáneamente. Además, en el lugar de proteínas purificadas, se pueden usar lisados y extractos celulares para producir un sistema apropiado de prueba libre de células.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de enlace puede ser detectada por medio de una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede ser cuantificada usando, por ejemplo, proteínas etiquetadas detectablemente, como por ejemplo polipéptidos ActRIIB o su proteína de enlace radioetiquetados (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), etiquetados fluorescentemente (por ejemplo, FITC), o etiquetados enzimáticamente, por inmunopruueba o por detección cromatográfica.

En ciertos modos de realización, la presente invención se refiere al uso de pruebas de polarización fluorescente y pruebas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de enlace. Adicionalmente, otros modos de detección, como aquellos basados en guías de onda óptica (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de los Estados Unidos No. 5,677,196), resonancia por plasmón de superficie (SPR), sensores de carga de superficie y sensores de fuerza de superficie, son compatibles con muchas realizaciones de la invención.

5X

Además, la presente invención contempla el uso de una prueba de trampa de interacción, también conocida como el “ensayo de doble híbrido”, para identificar agentes que interrumpan o potencien la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de enlace. Ver, por ejemplo, patente de 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). En una realización específica, la presente invención se refiere al uso del sistema de doble híbrido reverso para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocien la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de enlace. Ver, por ejemplo, Vidal y Legrain, 1999, Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, 1999, Trends Biotechnol 17:374-81; y Pat. de Estados Unidos Nos. 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

En un modo de realización, los compuestos sujetos son identificados por su habilidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB de la invención. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción puede ser identificada en el nivel de la proteína mediante métodos bioquímicos in vitro, incluyendo foto-reticulación, enlace de ligandos radioetiquetados y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En algunos casos, los compuestos pueden ser tamizados en una prueba basada en un mecanismo, tal como una prueba para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un evento de enlace de fase sólida o de fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB puede ser transfectado con un sistema de reporte (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa, o proteína fluorescente verde) a una célula y tamizado con la biblioteca, preferiblemente por un proceso de tamizaje de alto rendimiento, o con miembros individuales de la biblioteca. Se puede usar otra prueba de enlace basada en un mecanismo, por ejemplo, pruebas de enlace que detectan cambios en la energía libre. Las pruebas de enlace pueden ser realizadas con el objetivo fijado a un frasco, un glóbulo o un chip, o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por medio de electroforesis capilar.

Los compuestos enlazados pueden ser detectados usualmente usando resonancia por plasmón de superficie o colorimetría o fluorescencia.

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a métodos y agentes para controlar la obesidad y el aumento de peso. A nivel celular, la proliferación y diferenciación de adipocitos es crítica en el desarrollo de la obesidad, lo que lleva a la generación de células grasas (adipocitos) adicionales. Por lo tanto, cualquier compuesto identificado puede ser probado en células o tejidos completos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su habilidad para modular la adipogénesis, midiendo la diferenciación o proliferación de adipocitos. Varios métodos conocidos en el arte pueden ser utilizados para este propósito. Por ejemplo, el efecto de un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido soluble ActRIIB) o compuestos de prueba de adipogénesis pueden ser determinados midiendo la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1 con adipocitos maduros en ensayos basados en células, tal como por observación de la acumulación de triacilglicerolos en vesículas teñidas con Oil Red O y por la apariencia de ciertos marcadores de adipocitos, como el FABP (aP2/422) y PPAR γ 2. Ver, por ejemplo, Reusch et al, 2000, *Mol Cell Biol.* 20:1008-20; Deng et al, 2000, *Endocrinology.* 141 :2370-6; Bell et al., 2000, *Obes Res.* 8:249-54. Otro ejemplo de estudio basado en células incluye el análisis del papel de los polipéptidos ActRIIB y los compuestos de prueba en la proliferación de adipocitos o células precursoras de adipocitos (por ejemplo, células 3T3-L1), tal como por monitoreo de las células positivas bromodeoxiuridina (BrdU). Ver, por ejemplo, Pico et al., 1998, *Mol Cell Biochem.* 189:1-7; Masuno et al., 2003, *Toxicol Sci.* 75:314-20.

Se entiende que los ensayos de tamizaje de la presente invención no se aplican sólo a los polipéptidos ActRIIB sujetos y a las variantes de los polipéptidos ActRIIB, sino también a cualesquiera compuestos de prueba, incluyendo agonistas y antagonistas de los polipéptidos ActRIIB o la señalización a través del ActRIIB. Adicionalmente, estas pruebas de tamizaje son útiles para propósitos de la verificación de objetivos de la droga y control de calidad.

6. Ejemplos de usos terapéuticos

En un modo de realización, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) de la presente invención pueden ser usados para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o condición médica que esté asociada a actividad anormal de un polipéptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB (por ejemplo, la activina o GDF8). En un modo de realización, la presente invención se refiere a métodos para prevenir o tratar a un individuo necesitado, a través de la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido ActRIIB, como se describe abajo. Estos métodos se buscan particularmente en los tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más en particular, de humanos.

Cómo se usa en la presente, una terapéutica que “previene” un trastorno o condición médica se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la ocurrencia del trastorno o condición médica en la muestra tratada, relativa a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la severidad de uno o más síntomas del trastorno o condición médica, relativa a la muestra de control no tratada. El término “tratamiento”, como se usa en la presente, incluye la profilaxis de la condición médica nombrada o la mejoría o eliminación de la condición médica una vez que haya sido establecida.

Como se demuestra en la presente, el ActRIIB-Fc promueve la expresión de UCPI, una proteína que media el desacoplamiento mitocondrial, lo que lleva a tejido adiposo, metabólicamente activo, o termogénico. De acuerdo a esto, los compuestos divulgados en la presente pueden ser usados para tratar varios trastornos, tales como una deficiencia en tejido adiposo marrón o adipocitos marrones, síndrome metabólico (también conocido como síndrome X), diabetes, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, ingesta en exceso y bulimia, hipertensión, arteriosclerosis (enfermedad de las arterias coronarias o enfermedad coronaria de corazón), infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, infarto cerebral, trombosis cerebral, trastornos respiratorios (como el síndrome de Pickwick), cánceres en el colon, la próstata, el seno, endometrio, y riñones, sujetos con deficiencia de la hormona del crecimiento, variante normal de talla baja, síndrome de Turner, y otras condiciones

patológicas que muestren actividad metabólica reducida o un descenso en el gasto de energía en estado de reposo como un porcentaje del total de masa libre de grasa, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda infantil.

En un modo de realización, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos solubles ActRIIB) de la invención son usados para promover la formación y/o la actividad de adipocitos termogénicos. Como se discutió más arriba, el tejido adiposo marrón discreto termogénico y los adipocitos marrones dentro de tejido adiposo blanco contienen gran número de mitocondrias que expresan la proteína desacopladora 1 (UCP). Los individuos con rica ingesta calórica que carecen de adipocitos marrones son incapaces de convertir el exceso de ingesta calórica en calor y se ven obligados por lo tanto a acumular energía bioquímica no usada, típicamente como abultado tejido adiposo blanco. Bloquear o antagonizar las funciones de uno o más ligandos ActRIIB (por ejemplo, GDF8) en vivo puede efectivamente aumentar la actividad termogénica de los adipocitos marrones en depósitos discretos o de adipocitos marrones distribuidos dentro del tejido adiposo blanco. Este enfoque es confirmado y sustentado por los datos mostrados en la presente, en el que se muestra que una proteína ActRIIB-Fc induce la expresión de UCPI en grasa blanca, aumenta la composición corporal global y mejora el estatus metabólico en ratones sometidos a una dieta rica en grasa.

En un modo de realización, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB solubles) de la invención son usados como parte de un tratamiento para síndrome metabólico (también conocido como síndrome X y síndrome de resistencia a la insulina), el cual es una combinación de trastornos y factores de riesgo que incrementan el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo II. La mayoría de pacientes son mayores, obesos, sedentarios, y tienen algún grado de resistencia a la insulina. La adiposidad central (abdominal o visceral) es una característica significativa del síndrome.

En un modo de realización relacionado, los polipéptidos solubles ActRIIB y otros compuestos de la invención pueden ser usados como parte de un tratamiento para la

diabetes mellitus tipo II (también conocida como diabetes mellitus no insulino-dependiente o diabetes iniciada en adultos), la cual está caracterizada por elevada glucosa en la sangre en el contexto de resistencia a la insulina y deficiencia de insulina relativa. Un número de cambios metabólicos complejos y multifactoriales en la diabetes a menudo llevan al deterioro y menoscabo funcional de muchos órganos, y de modo más importante del sistema cardiovascular. La diabetes mellitus tipo II está a menudo asociada con la obesidad (adiposidad abdominal o visceral), hipertensión, colesterol elevado, y síndrome metabólico. Importantes factores de riesgo para la diabetes mellitus tipo II incluyen el envejecimiento, dietas altas en grasa, y un estilo de vida sedentario. En otra realización relacionada, los polipéptidos ActRIIB solubles y otros compuestos de la invención pueden ser usados como parte de un tratamiento para la arteriosclerosis, una condición inflamatoria crónica en la cual las paredes de la arteria se hacen más gruesas debido a la acumulación de depósitos grasos, a menudo conocidos como placas. Los factores de riesgo para la arteriosclerosis incluyen el envejecimiento, diabetes mellitus, dislipoproteinemia, obesidad (adiposidad abdominal o visceral), y un estilo de vida sedentario.

Los polipéptidos ActRIIB solubles pueden también ser usados para trastornos lipodistróficos, que tienden a estar asociados con un síndrome metabólico. Se presenta resistencia severa a la insulina como resultado de algunas formas de lipodistrofia, tanto genética como adquirida, incluyendo en este último caso la lipodistrofia relacionada con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes tratados con terapia antirretroviral.

Los polipéptidos ActRIIB en cuestión pueden además ser usados como agentes terapéuticos para hacer más lento o prevenir el desarrollo de la obesidad. Este enfoque está confirmado y sustentado por los datos mostrados en el presente, en el que se ha mostrado que una proteína ActRIIB-Fc mejora el estatus metabólico en ratones sometidos a una dieta rica en grasa.

En otras formas de realización, la presente invención se refiere a compuestos y métodos para regular la grasa corporal contenida en un animal y para el tratamiento de prevención de condiciones relacionadas con esto, y particularmente, condiciones que

comprometan la salud relacionadas con esto. De acuerdo a la presente invención, regular (controlar) el peso corporal puede llevar a reducir o aumentar el peso corporal, reducir o incremental la tasa de aumento de peso, o aumentar o reducir la tasa de pérdida de peso, y también incluye mantener de manera activa, o no cambiar significativamente, el peso corporal (por ejemplo, contra influencias internas o externas que pueden de otra manera aumentar o reducir el peso corporal). Una realización de la presente invención se refiere a regular el peso corporal administrando a un animal (por ejemplo, un humano) necesitado de ello un polipéptido ActRIIB.

En una forma de realización específica, la presente invención se refiere a métodos y compuestos para reducir el peso corporal y/o reducir el aumento de peso en un animal, y más particularmente, para tratamiento o mejoramiento de la obesidad en pacientes con riesgo de sufrir o que sufren de obesidad. En otra realización específica, la presente invención está dirigida a métodos y compuestos para tratar a un animal que sea incapaz de aumentar o retener peso (por ejemplo, un animal con síndrome del desgaste). Tales métodos son efectivos para aumentar el peso y/o masa corporal, o para reducir la pérdida de peso y/o masa, o para mejorar las condiciones asociadas con o causadas por un peso y/o masa corporal indeseablemente bajo (es decir, malsano).

Como se demuestra en WO 2006/012627 y WO 2008/097541, los compuestos divulgados aquí estimulan el crecimiento muscular. De acuerdo a esto, estos compuestos pueden ser particularmente útiles en enfermedades o condiciones médicas con disfunciones musculares y metabólicas coincidentes.

En una realización específica, los compuestos (por ejemplo, los polipéptidos solubles ActRIIB) de la invención son usados como parte del tratamiento para una distrofia muscular. El término “distrofia muscular” se refiere a un grupo de enfermedades músculo degenerativas caracterizadas por un gradual debilitamiento y deterioro de los músculos esqueléticos y algunas veces de los músculos respiratorios y del corazón. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por un desgaste y debilidad progresivos del músculo que empiezan con cambios microscópicos en el músculo. A medida que los

músculos se degeneran con el tiempo, la fuerza muscular de la persona declina. Además, la masa muscular deteriorada y la disminución de la actividad física contribuyen a un desbalance entre la ingesta calórica y el gasto de energía, llevando a una acumulación malsana de exceso de energía como tejido adiposo blanco. Ejemplos de distrofias musculares que puede ser tratadas con un régimen que incluya los polipéptidos ActRIIB en cuestión incluyen: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (DMB), Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (DMED), Distrofia Muscular de la cintura y las extremidades (LGMD, por su sigla en inglés), Distrofia Muscular Facioscapulohumeral (DFSH o FSHD) (también conocida como de Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotónica (DMM) (también conocida como Enfermedad de Steinert), Distrofia Muscular Oculofaríngea (DMOF), Distrofia Muscular Distal (DD), Distrofia Muscular Congénita (DMC).

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) fue descrita primero por el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en los años 1860. La Distrofia Muscular de Becker (DMB) tiene su nombre por el doctor alemán Peter Emil Becker, quien describió primero esta variante de la DMD en los años 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en machos, afectando a uno de cada 3,500 muchachos. La DMD se da cuando se rompe el gen distrofina, ubicado en el brazo corto del cromosoma X. Ya que los machos solo cargan una copia del cromosoma X, solo tienen una copia del gen distrofina. Sin el gen distrofina, el músculo es fácilmente perjudicado durante los ciclos de contracción y relajación. Si bien al comienzo de la enfermedad el músculo se compensa por regeneración, más adelante las células progenitoras del músculo no pueden mantenerse al ritmo del daño continuo y el músculo sano es reemplazado por tejido graso fibroso no funcionales.

La DMB resulta de diferentes mutaciones en el gen distrofina. Los pacientes de DMB tienen algo de distrofina, pero es ya bien insuficiente en cantidad o pobre en calidad. Tener un poco de distrofina protege al músculo de aquellos con DMB de degenerarse tanto o tan rápido como aquel de la gente con DMD.

Por ejemplo, en investigaciones recientes se ha demostrado que bloquear o eliminar la función de GDF8 (un ligando ActRIIB) en vivo puede efectivamente tratar por lo menos algunos síntomas en pacientes con DMD y DMB. Así los polipéptidos ActRIIB en cuestión pueden actuar como inhibidores de GDF8 (antagonistas), y constituir un medio alternativo de bloquear las funciones de GDF8 y/o ActRIIB en vivo en pacientes con DMD y DMB. Este enfoque está confirmado y sustentado por los datos mostrados en la presente, en donde se muestra que una proteína ActRIIB-Fc incrementa la masa muscular en un modelo de ratón de distrofia muscular.

De modo similar, los polipéptidos ActRIIB en cuestión se refieren a un medio efectivo para aumentar la masa muscular en otras condiciones de enfermedad que tienen necesidad de crecimiento de músculo. Por ejemplo, la ELA, también llamada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad neuro-motora) es un trastorno SNC crónico, incurable e imposible de detener que ataca las neuronas motoras, componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos del esqueleto. En ELA, las neuronas motoras se deterioran y eventualmente mueren, y aunque el cerebro de la persona normalmente se mantiene funcionando por completo y alerta, la orden para moverse nunca alcanza a los músculos. La mayoría de las personas a las que les da ELA están entre los 40 y 70 años. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son aquellas que dirigen a los brazos y las piernas. Aquellos con ELA pueden tener problemas al caminar, pueden dejar caer cosas, caerse, arrastrar sus palabras, y reír o llorar de modo incontrolable. Eventualmente, los músculos en los miembros se empiezan a atrofiar por la enfermedad. Esta debilidad del músculo se convertirá debilitante y la persona necesitará una silla de rueda o se volverá incapaz de funcionar por fuera de la cama. La mayoría de pacientes con ELA mueren por fallos respiratorios o por complicaciones de la asistencia ventilatoria como la neumonía, de 3 a 5 años del inicio de la enfermedad. Este enfoque está confirmado y sustentado por los datos mostrados en la presente, donde se muestra que un proteína ActRIIB-Fc mejora la apariencia, masa muscular y tiempo de vida de un modelo de ratón de ELA.

El aumento de la masa muscular inducido por el polipéptido ActRIIB también puede beneficiar a aquellos que sufren de la enfermedad de desgaste muscular. Gonzalez-

Cadavid et al. (ver arriba) reportaron que la expresión de GDF8 se correlaciona inversamente con la masa libre de grasa en humanos y la expresión aumentada del gen de GDF8 está asociada con pérdida de peso en hombres con síndrome de desgaste del SIDA. Al inhibir las funciones de GDF8 en pacientes con SIDA, por lo menos algunos síntomas del SIDA pueden ser aliviados, si no completamente eliminados, mejorando así significativamente la calidad de vida en pacientes con SIDA.

La sarcopenia, o sea, la pérdida de músculo con el envejecimiento, está también usualmente asociada con el síndrome metabólico, diabetes, arteriosclerosis, dislipidemia, y otras condiciones metabólicas relacionadas con la edad. La masa muscular inducida mediante el polipéptido ActRIIB también puede beneficiar a aquellos que sufren de sarcopenia.

7. Composiciones farmacéuticas

En un modo de realización, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) de la presente invención están formulados con un portador aceptable farmacéuticamente. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede ser administrado solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden ser formulados para administración de cualquier modo conveniente para uso en humanos o en medicina veterinaria.

En un modo de realización, el método terapéutico de la invención incluye la administración de la composición tópicamente, sistemáticamente, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención es, por supuesto, en una forma libre de pirógenos, fisiológicamente aceptable. Además, es deseable que la composición pueda ser encapsulada o inyectada en forma viscosa para la aplicación a un objetivo en un sitio del tejido (por ejemplo, hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo un sitio que tenga un daño en el tejido. La administración tópica puede ser adecuada para la reparación de tejidos y curación de heridas. Otros agentes terapéuticos útiles diferentes a los polipéptidos ActRIIB que pueden también ser alternativamente incluidos en la composición como se describe arriba, pueden

alternativamente o adicionalmente, ser administrados simultáneamente o secuencialmente con los compuestos en cuestión (tal como polipéptidos ActRIIB) en los métodos de la invención.

En ciertos modos de realización, los compuestos de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de aplicar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB) en un sitio objetivo del tejido, que proporcionen una estructura para el desarrollo del tejido y sean óptimamente capaces de ser reabsorbidos en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIB. Tales matrices pueden formarse con materiales actualmente en uso para otras aplicaciones de implantaciones médicas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia estética y propiedades de la interfaz. La aplicación particular de los compuestos sujeto definirá la formulación adecuada. Matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, tricalciofosfato, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridas biodegradables y definidas químicamente. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, como huesos o colágeno dérmico. Matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no-biodegradables y químicamente definidas, como hidroxiapatita sinterizada, bioglass, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar formadas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados arriba, como el ácido poliláctico y la hidroxiapatita o colágeno y tricalciofosfato. La biocerámica puede modificarse en la composición, como en el fosfato-aluminato-calcio, y en el procesamiento para alterar el tamaño del poro, tamaño de la partícula, forma de la partícula, y biodegradabilidad.

En ciertos modos de realización, los métodos de la invención pueden ser administrados oralmente, por ejemplo, en la forma de cápsulas, tabletas, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base con sabor agregado, usualmente 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 un jarabe, o como un caramelo (usando una base inerte, como gelatina o glicerina, o sacarosa o acacia) y/o como un enjuague bucal y similares, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente también puede ser administrado como un bolo, electuario o pasta.

En formas sólidas de dosificación para la administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención pueden ser mezclados con uno o más portadores aceptables farmacéuticamente, como el citrato de sodio o el fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido; (2) aglomerantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil, pirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes de desintegración, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos cuaternarios de amonio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilén glicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, los compuestos farmacéuticos también pueden contener agentes tampones químicos. Los compuestos sólidos de tipo similar también pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras, utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilén glicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas líquida de dosificación 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 el arte, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes de solubilización y emulsificantes, tales como alcohol etílico,

alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilén glicol, 1,3-butilén glicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, castor, y sésamo), glicerol, tetrahidrofuril alcohol, polietilén glicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los mismos. Junto a los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes de humectación, emulsificantes y agentes de suspensión, agentes endulzantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

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

Algunos compuestos divulgados en la presente pueden ser administrados tópicamente, ya sea a la piel o a las membranas mucosas. Las formulaciones tópicas pueden además incluir uno o más de la amplia variedad de agentes conocidos por ser efectivos potenciadores de la penetración en la capa córnea o en la piel. Ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenoglicol, alcohol metil o isopropil, dimetilsulfóxido, y azone. Más agentes adicionales pueden ser incluidos para hacer la formulación cosméticamente aceptable. Ejemplos de estos son grasas, ceras, aceites, tintes, fragancias, preservativos, estabilizadores, y agentes activos de superficie. Agentes queratolíticos como los conocidos en el arte pueden también ser incluidos. Ejemplos son el ácido salicílico y el azufre.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier tampón químico, preservativos o propulsores que puedan ser requeridos. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del compuesto de esta invención (por ejemplo, un polipéptido ActRIIB), excipientes, tales como grasas vegetales y animales, aceites, ceras, parafinas, almidón,

tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y aerosoles pueden contener, además del compuesto sujeto en esta invención, excipientes como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores usuales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como el butano y el propano.

En una forma de realización, los compuestos farmacéuticos adecuados para administración parenteral pueden incluir uno o más polipéptidos ActRIIB, en combinación con una o más emulsiones, suspensiones, dispersiones o soluciones, acuosas o no acuosas, isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones o en dispersiones estériles inyectables justo antes de usarlas, las cuales pueden contener antioxidantes, tampón químicos, bacteriostáticos, solutos que suministran la formulación isotónica con la sangre del receptor destino o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de portadores adecuados acuosos y no acuosos que pueden ser empleados en los compuestos farmacéuticos de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilén glicol, polietilén glicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y por medio del uso de surfactantes.

Los compuestos de la invención pueden contener también adyuvantes, tales como preservativos, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser asegurada por la inclusión de varios agentes antibacteriales y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en los compuestos. Adicionalmente, la absorción

prolongada de la forma farmacéuticamente inyectable puede ser realizada por medio de la inclusión de agentes que retrasen la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Se entiende que el régimen de dosis será determinado por el médico tratante, considerando varios factores que modifican la acción de los compuestos materia de la invención (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB). Los varios factores dependerán de la enfermedad a ser tratada.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la terapia génica para la producción en vivo de polipéptidos ActRIIB u otros compuestos divulgados en la presente. Dicha terapia conseguiría su efecto terapéutico por medio de la introducción de secuencias de polinucleótidos ActRIIB en las células o tejidos que tengan los trastornos que se enlistan arriba. El suministro de secuencias de polinucleótidos ActRIIB puede conseguirse usando un vector de expresión recombinante como un virus quimera o un sistema de dispersión coloidal. Para el suministro terapéutico de secuencias de polinucleótidos ActRIIB se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

Varios vectores virales que pueden ser utilizados para terapia génica como se enseña en la presente incluyen adenovirus, virus herpes, virus vacuna o, preferentemente, un virus ARN, como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o retrovirus de ave. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que se pueden identificar y generar las células transducidas. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos para un objetivo atacando, por ejemplo un azúcar, un glucolípido, o una proteína. El objetivo preferido se consigue usando un anticuerpo. Los expertos en el arte reconocerán que secuencias de polinucleótidos específicas se pueden insertar en el genoma

retroviral o adjuntado a una cápsula viral para permitir el suministro específico al objetivo del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIB. En una forma de realización preferida, el vector es dirigido al tejido/células del hueso, cartilago, músculo o neurona.

Alternativamente, las células de cultivo de tejido pueden ser directamente transfectadas con plásmidos codificando los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, por medio de transfección mediante fosfato de calcio convencional. Estas células son luego transfectadas 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 ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, gotas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas con membranas artificiales que son útiles como vehículos de suministro in vitro y en vivo. El ARN, ADN y los viriones intactos se pueden encapsular dentro del interior acuoso y suministrados a las células de una forma biológicamente activa (Fraley, y col., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Se conocen en el arte métodos para la eficiente transferencia de genes usando un vehículo liposoma, ver por ejemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es usualmente una combinación de fosfolípidos, usualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. Otros fosfolípidos u otros lípidos pueden también ser usados. Las características físicas de los liposomas dependen de pH, fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

Entre los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas se incluyen los compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Entre los fosfolípidos ilustrativos se incluyen la fosfatidilcolina de huevo, la dipalmitoilfosfatidilcolina y la distearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de liposomas es también posible basado en,

por ejemplo, la especificidad de órgano, especificidad de célula y especificidad de organelos, y es conocido por aquellos versados en la materia.

EJEMPLIFICACIÓN

La invención que se ha descrito hasta ahora en términos generales puede ser más fácilmente entendida por medio de referencias a los siguientes ejemplos, que están incluidos solamente para propósitos de ilustrar algunos modos de realización de la presente invención, y su intención no es la de limitar la invención.

Ejemplo 1. Generación de una proteína de fusión ActRIIB-Fc

Los Solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIB soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIB humana fusionado a un dominio Fc de humano o ratón, con un enlazador mínimo (tres ácidos amino glicina) entre ellos. Los constructos son nombrados como ActRIIB(20-134)-hFc y ActRIIB(20-134)-mFc, respectivamente.

Se muestra abajo el ActRIIB-hFc tal como se purificó a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 5)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWCWLD
DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKGKEYCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGPREPOVYTL
PSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWOOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

Las proteínas ActRIIB(20-134)-hFc y ActRIIB(20-134)-mFc fueron expresadas en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

(i) Melitina de abeja de miel (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
(SEQ ID NO : 7)

(ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
(SEQ ID NO: 8)

(iii) Nativa: MGAAAKLAF AVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 9).

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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNOSGLERCEGEQDK
RLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPOVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNK
ALPVPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 17)

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos (SEQ
 ID NO: 10):

ATGGATGCAAT	GAAGAGAGGG	CTCTGCTGTG	TGCTGCTGCT	GTGTGGAGCA
GTCTTCGTTT	CGCCCGGCGC	CTCTGGGCGT	GGGGAGGCTG	AGACACGGGA
GTGCATCTAC	TACAACGCCA	ACTGGGAGCT	GGAGCGCACC	AACCAGAGCG
GCCTGGAGCG	CTGCGAAGGC	GAGCAGGACA	AGCGGCTGCA	CTGCTACGCC
TCCTGGCGCA	ACAGCTCTGG	CACCATCGAG	CTCGTGAAGA	AGGGCTGCTG
GCTAGATGAC	TTCAACTGCT	ACGATAGGCA	GGAGTGTGTG	GCCACTGAGG
AGAACCCCCA	GGTGTACTTC	TGCTGCTGTG	AAGGCAACTT	CTGCAACGAG
CGCTTCACTC	ATTTGCCAGA	GGCTGGGGGC	CCGGAAGTCA	CGTACGAGCC
ACCCCCGACA	GCCCCACCG	GTGGTGGAAC	TCACACATGC	CCACCGTGCC
CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG	TCTTCCTCTT	CCCCCAAAA
CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA	CATGCGTGGT
GGTGGACGTG	AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTCAAC	TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA	GGAGCAGTAC
AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTCCTGC	ACCAGGACTG
GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA	GCCCTCCCAG
TCCCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC	CCGAGAACCA
CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC	ATCCCGGGAG	GAGATGACCA	AGAACCAGGT
CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	TCCCAGCGAC	ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGGAGAACA	ACTACAAGAC	CACGCCTCCC
GTGCTGGACT	CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TATAGCAAGC	TCACCGTGGA
CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC	GTGATGCATG
AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAAGA	GCCTCTCCCT	GTCTCCGGGT
AAATGA				

La secuencia N-terminal del material producido con la célula CHO reveló una importante secuencia de -GRGEAE (SEQ ID NO: 11). De modo notable, otros constructos reportados en la literatura comienzan con una secuencia -SGR.

La purificación se puede alcanzar por medio de una serie de pasos de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en Q sefarosa, cromatografía en fenil sefarosa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio de catión. La purificación podría ser completada con filtración viral y cambio del tampón químico.

Las proteínas de fusión ActRIIB-Fc también fueron expresadas en células HEK293 y en células COS. Aunque el material de todas las líneas celulares y condiciones razonables de cultivo proporcionaron proteína con actividad de construcción de músculo en vivo, se observó variabilidad en la potencia, tal vez relacionada con la selección de líneas celulares y/o las condiciones de cultivo.

Ejemplo 2: Generación de Mutantes ActRIIB-Fc

Los Solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre ActRIIB extracelular y un dominio Fc. La fusión de fondo ActRIIB-Fc tiene la secuencia (la porción Fc está subrayada)(SEQ ID NO: 12):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYCKKVSNAKALPVPIEKTISKAKGPREPOVYTL
PPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWOOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSPGK

Varias mutaciones, incluyendo los truncamientos N- y C-terminal, fueron introducidas en la proteína ActRIIB-Fc de fondo. Basados en los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que a estos constructos, si se expresan con un líder TPA, les falte la serina N-terminal. Las mutaciones fueron generadas en un dominio extracelular ActRIIB

por medio de mutagénesis PCR. Después de PCR, los fragmentos fueron purificados a través de una columna de Qiagen, digeridos con SfoI y AgeI y gel purificado. Estos fragmentos fueron ligados en el vector de expresión pAID4 (ver WO2006/012627), para que sobre la ligación creara quimera de fusión con IgG1 humano. Sobre la transformación en *E. coli* DH5 alfa, se recogieron colonias y los ADNs fueron aislados. Para los constructos murinos (mFc), se substituyó un IgG2a murino por un IgG1 humano. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

Todos los mutantes fueron producidos en células HEK293T por medio de transfección transitoria. En resumen, en un centrifugador de 500ml, células HEK293T fueron puestas a 6×10^5 cells/ml en un medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250ml y puestas a cultivar durante la noche. Al día siguiente, estas células fueron tratadas con complejo DNA:PEI (1 : 1) a 0.5 ug/ml, concentración final de ADN. Después de 4 horas, se añadió 250 ml de medio y las células fueron puestas a cultivar por 7 días. El medio acondicionado fue cosechado dando vuelta hasta asentar las células y concentrado.

Los mutantes fueron purificados usando una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, una columna de proteína A y eluidos con un tampón glicina de bajo pH (3.0). Después de la neutralización, éstos fueron dializados contra PBS.

Los mutantes también fueron producidos en células CHO por medio de una metodología similar.

Los mutantes fueron puestos a prueba en pruebas de enlace y/o biopruebas. En algunos casos, las pruebas fueron llevadas a cabo con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas. Las variantes son descritas, por ejemplo, en solicitudes de patentes publicadas WO 06/012627 y WO 08/097541. Tales variantes pueden ser usadas en los métodos descritos en el presente.

Ejemplo 3: Efecto del ActRIIB(20-134)-hFc en las propiedades termogénicas de tejido adiposo blanco en ratones alimentados con una dieta rica en grasas.

Los Solicitantes investigaron los efectos de ActRIIB-Fc en adipocitos marrones y otros parámetros metabólicos en ratones machos con una dieta rica en grasa. Ratones C57BL/6 de diez semanas fueron igualados en su peso y tratados con ActRIIB(20-134)-hFc (n = 10) o Vehículo Solución salina temporada con Tris (TBS) (n = 7) dos veces por semana a 10 mg/kg, s.c, durante 60 días. Durante este período, los ratones tenían acceso ilimitado a una dieta que contenía 58% de grasa en lugar de su comida estándar que contenía 4.5% de grasa. Al final del estudio, se recolectaron las almohadillas de grasa epididimaria, y se usó RT-PCR cuantitativa (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) para medir los niveles mRNA que codifican la proteína desacopladora - 1 (UCPI), un marcador bastante documentado de la habilidad termogénica en adipocitos marrones, que están distribuidos difusamente dentro de los depósitos adiposos blancos (Cousin et al, 1992, J Cell Sci 103:931-942).

El tratamiento ActRIIB(20-134)-hFc causó una constelación de efectos metabólicos notables. En ratones en una dieta rica en grasa, ActRIIB(20-134)-hFc incrementó los niveles de UCPI mRNA en la grasa epididimaria casi nueve veces comparado con el vehículo (Figura 1; $P < 0.05$), un efecto particularmente impresionante dado que los ratones C57BL/6 muestran inducción severamente debilitada de UCPI y adipocitos marrones dentro de los depósitos de grasa blancos claves, comparados con otras cepas de ratones (Guerra et al., 1998, J Clin Invest 102:412-420; Xue et al., 2007, J Lipid Res 48:41-51). ActRIIB(20-134)-hFc también produjo una reducción beneficiosa del 30% ($P < 0.001$) de concentraciones ácidas grasas libres de suero. De modo importante, el aumento de UCPI se vio acompañado de efectos benéficos del ActRIIB(20-134)-hFc en la composición corporal, como se determinó por medio de resonancia magnética nuclear (NMR) al inicio de la prueba y en el día 48. Bajo condiciones dietarias ricas en grasas, el total de masa grasa en controles tratados con el vehículo se triplicó durante este período de 48 días, y el tratamiento con ActRIIB(20-134)-hFc cortó este incremento en 40%. Para el día 48, el total de masa grasa era de 26% del peso corporal en ratones tratados con ActRIIB(20-134)-hFc-

vs. 39% en ratones de control, mientras que la masa delgada de tejido era de 64% del peso corporal en ratones tratados con ActRIIB-Fc vs. 55% en ratones de control. Así, el resultado neto fue una composición corporal más saludable bajo condiciones de dieta rica en grasa.

Ejemplo 4: Efecto de la variante truncada ActRIIB(25-131)-hFc en las propiedades termogénicas de tejido adiposo blanco en ratones alimentados con una dieta rica en grasa.

En el estudio descrito arriba (Ejemplo 3), los Solicitantes también investigaron los efectos de la variante truncada ActRIIB(25-131)-hFc en las propiedades termogénicas del tejido adiposo blanco y otros parámetros metabólicos, bajo condiciones dietarias ricas en grasa.

Los Solicitantes generaron una proteína ActRIIB(25-131)-hFc de fusión truncada (Figuras 13-14), usando el mismo líder y metodología como se describió arriba con respecto a la ActRIIB(20-134)-hFc. La proteína madura purificada después de la expresión en células CHO tiene la secuencia mostrada abajo (SEQ ID NO: 6):

ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC
YDRQECVATE ENPOVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTGGG THTCPPCPAP
 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV WDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP
 PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

Se sometieron ratones C57BL/6 de diez semanas de edad a tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc, a 10 mg/kg, s.c., o vehículo de solución salina tamponada con Tris (TBS) dos veces por semana durante 60 días. Durante este periodo, los ratones tenían acceso ilimitado a una dieta que contenía 58% de grasa en lugar de la comida estándar que contenía 4,5% de grasa. Un grupo adicional de ratones mantenidos en la dieta de comida estándar también fue tratado con el vehículo TBS y seguido como control dietario.

Bajo condiciones dietarias ricas en grasa, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc detonó cambios histológicos y un perfil de expresión genética en tejido adiposo blanco que fueron consistentes con la habilidad termogénica. Como se muestra en la figura 2, el examen histológico de la grasa blanca epididimaria indicó que la ActRIIB(25-131)-hFc redujo el tamaño de las gotas de lípido y causó la formación de grupos de adipocitos multiloculares que son distintivos de la grasa marrón. Además, el análisis inmunohistoquímico de este tejido reveló inducción citoplásmica generalizada de UCP1, tanto en los adipocitos multiloculares como los uniloculares como resultado del tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc (Figura 2).

Acompañando estos cambios histológicos hubo cambios significativos en la expresión de genes reguladores metabólicos o termogénicos claves en la grasa blanca epididimaria, como se determinó por RT-PCR cuantitativo. En ratones en una dieta rica en grasa el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles mRNA de UCP1 en más de 60 veces comparado con el vehículo (Figura 3), un cambio particularmente impresionante ya que, como se anotó arriba, esta cepa de ratones muestra una inducción severamente debilitada de UCP1 y adipocitos marrones dentro de depósitos grasos blancos claves, en comparación con otras cepas de ratones. Adicionalmente, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles de mRNA que codifica la sirtuina SIRT-I (regulador de la información silenciosa, homólogo 1) (Figura 4), un regulador maestro sensible a la energía (deacetilasa) que protege contra el daño metabólico inducido por una dieta rica en grasa (Pfiuger et al, 2008, Proc Natl Acad Sci USA 105:9793-9798) y está implicado como un importante control de la movilización ácida grasa (Rodgers et al., 2008, FEBS Lett 582:46-53). De modo significativo, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc también incrementó los niveles de mRNA que codifica PGC-1 α (co-activador 1 α del receptor *gamma* activado del proliferador de peroxisomas) (Figura 5), un objetivo bastante documentado del SIRT-I que, a su vez, controla la expresión de muchos genes necesarios para la biogénesis mitocondrial y la habilidad termogénica en tejido adiposo marrón (Uldry et al., 2006, Cell Metab, 3:333-341). Notablemente, se ha mostrado que la expresión forzada de PGC-1 α en adipocitos blancos induce un programa termogénico de expresión genética, incluyendo la

UCPI, asemejándose cercanamente a la de los adipocitos marrones (Hansen et al, 2006, *Biochem J* 398:153-168). En el presente estudio, ActRIIB(25-131)-hFc restauró la expresión genética de PGC-1 α en tejido adiposo blanco, bajo condiciones dietarias ricas en grasa, hasta niveles imposibles de distinguir de aquellos en los ratones alimentados con la dieta estándar (Figura 5).

Los cambios adicionales asociados con el tratamiento constituyen un vínculo prominente entre el perfil de expresión alterada en tejido adiposo blanco y efectos metabólicos y hormonales benéficos. Así, en grasa blanca epididimaria, ActRIIB(25-131)-hFc aumentó los niveles de mRNA que codifica la Foxo-1 (proteína O subfamilia 1 que contiene una caja forkhead) (Figura 6), un factor de transcripción que es tanto un objetivo de SIRT-1 como un inductor clave de la expresión de adiponectina (Qiao et al., 2006, *J Biol Chem* 281 :39915-39924). La adiponectina, una hormona derivada de la grasa cuya concentración varía inversamente con la masa/obesidad grasa, ejerce importantes acciones de sensibilidad a la insulina en tejidos diana (Yamauchi et al., 2001, *Nat Med* 7:941-946; Maeda et al., 2002, *Nat Med* 8:731-737; Kadowaki et al., 2005, *Endocr Rev* 26:439-451). Consistente con la inducción Foxo-1 mRNA, el tratamiento ActRIIB(25-131)-hFc elevó los niveles de mRNA de adiponectina en grasa blanca epididimaria (Figura 7) así como en concentraciones circulatorias de adiponectina (Figura 8). De modo importante, estos cambios estuvieron acompañados en los ratones tratados con ActRIIB(25-131)-hFc por un fuerte decrecimiento en la insulina circulante (Figura 9), triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de baja densidad (LDL), llevando a la normalización de casi todos estos parámetros. Finalmente, los efectos antes mencionados estuvieron acompañados por cambios benéficos en la composición corporal, como se determinó por resonancia magnética nuclear (NMR) en el inicio y en el día 48. Específicamente, la masa de grasa total en los controles tratados con el vehículo bajo condiciones dietarias ricas en grasa se triplicó durante este período de 48 días, y el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc cortó este incremento por casi 40%. En resumen, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc bajo condiciones dietarias ricas en grasa dio como resultado 1) cambios histológicos y un perfil de expresión de genes en tejido adiposo

blanco que fueron consistentes con la capacidad termogénica, 2) cambios benéficos en un amplio rango de parámetros metabólicos y hormonales, y 3) una composición corporal mejorada.

Ejemplo 5: Efecto de la ActRIIB(25-131)-mFc en depósitos de grasa marrón en ratones alimentados con una dieta rica en grasa

En otro estudio, los Solicitantes investigaron los efectos de la variante truncada ActRIIB(25-131)-mFc sobre las propiedades de los depósitos de grasa marrón interescapular bajo condiciones dietarias ricas en grasa. Ratones C57BL/6 de nueve semanas fueron tratados con ActRIIB(25-131)-mFc ($n = 20$), a 10 mg/kg, s. c, o vehículo solución salina temporada con Tris (TBS) ($n = 10$) dos veces por semana durante 60 días. Comenzando 7 días antes del comienzo de la dosificación, los ratones tuvieron acceso ilimitado a una dieta que contenía 58% de grasa en lugar de la comida estándar que contenía 4.5% de grasa. En grupo adicional de ratones ($n = 10$) mantenidos en la dieta de comida estándar fueron también tratados con el vehículo TBS, y seguidos como un control dietario.

Comparada con la dieta estándar, la dieta rica en grasa produjo varios cambios notables en el depósito interescapular de tejido adiposo marrón, y el tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc invirtió ya sea completamente o en gran medida cada uno de estos cambios. Específicamente, la dieta rica en grasa causó un crecimiento pronunciado de los depósitos interescapulares así como un aclaramiento de su color de rojo a rosa (Figura 10). Este crecimiento inducido por la dieta reflejó una duplicación de la masa (Figura 11) y una reducción en la densidad (Figura 12) de los depósitos de grasa marrón. La densidad de los depósitos fue determinada por tomografía microcomputarizada (microCT) in situ para un subconjunto de ratones ($n = 4$ por grupo) cuyos porcentajes de total de grasa corporal, como se determinó por resonancia magnética nuclear (NMR), estuvieron más cercanos a los medios del grupo (todos los ratones fueron escaneados por NMR. En cualquier caso, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc revirtió completamente los cambios inducidos por la dieta en la masa de grasa marrón (Figura 11) y la densidad (Figura 12), mientras revirtió en

gran medida los cambios inducidos por la dieta en tamaño y color del depósito (Figura 10). Estos resultados indican que, bajo condiciones dietarias ricas en grasa, la ActRIIB(25-131)-mFc en gran medida o completamente restablece las propiedades que son probables de corresponderse con el funcionamiento de grasa marrón saludable y así mejora la calidad de la grasa marrón como reduce el tamaño general de los depósitos de grasa marrón.

Tomados juntos, estos datos indican que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc soluble pueden ser usadas como antagonistas de señalización por ligandos de familia TGF para aumentar la formación y/o actividad de adipocitos marrones termogénicos, y por lo tanto, para tratar condiciones metabólicas exacerbadas por una ingesta calórica alta y potencialmente otras condiciones médicas también.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente están incorporadas en la presente por referencia en su totalidad como si cada publicación o patente individual estuviera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada por referencia.

A pesar de que formas de realización específicas del tema que nos ocupa han sido discutidas, la especificación antes mencionada es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones se harán evidentes para aquellos expertos en el arte en la revisión de esta especificación y las reivindicaciones de más abajo. El alcance total de la invención debería ser determinado por referencia a las reivindicaciones, junto a su alcance total de equivalentes, y la especificación, junto a dichas variaciones.

Reivindicaciones:

1. Un método para aumentar los adipocitos termogénicos en un paciente que lo requiera, en donde el método consiste en la administración de una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado de un grupo que consiste de:
 - a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que sea por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:2; y
 - b. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que hibride, bajo estrictas condiciones de hibridación, con el ácido nucleico de SEQ ID NO: 3.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un dímero.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende una porción heteróloga de ActRIIB
4. Un método según la reivindicación 3, en el que el polipéptido está fusionado con un dominio constante de una inmunoglobulina.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que el polipéptido está fusionado a una porción Fc de una inmunoglobulina.
6. Un método según la reivindicación 5, en el que la inmunoglobulina es un IgG1 humano.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO:5 o 6.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el paciente tenga un trastorno metabólico.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el paciente tenga un trastorno muscular y un trastorno metabólico.

10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que sea por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 of SEQ ID NO:2.
11. Un método según la reivindicación 10, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que sea por lo menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 of SEQ ID NO:2.
12. Un método según la reivindicación 11, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que sea por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 of SEQ ID NO:2.
13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que sea por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 of SEQ ID NO:2.
14. Un método según la reivindicación 13, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que sea por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:2.
15. Un método según la reivindicación 14, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que sea por lo menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:2.
16. Un método según la reivindicación 15, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que sea por lo menos 99% idéntica a la secuencia de 25-131 de SEQ ID NO:2.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que la administración del compuesto promueve la expresión de UCP-I en adipocitos del paciente tratado.
18. Un método según la reivindicación 17, en el que la expresión de UCP-I es aumentada en el tejido adiposo blanco.

19. Un método para incrementar los adipocitos termogénicos en un paciente en necesidad del mismo, en donde el método comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:
- a. un antagonista de ActRIIB;
 - b. un antagonista de miostatina;
 - c. un antagonista de activina;
 - d. un antagonista de GDF11;
 - e. un antagonista de Nodal; y
 - f. un antagonista de GDF3.
20. Un método según la reivindicación 19, en el que el compuesto es un antagonista de ActRIIB.
21. Un método según la reivindicación 20, en el que el antagonista de ActRIIB es seleccionado del grupo que consiste de: un anticuerpo que se enlace con ActRIIB y un ácido nucleico que hibride con un ácido nucleico que codifique ActRIIB e inhiba la producción de ActRIIB.
22. Un método según la reivindicación 19, en el que el compuesto es un antagonista de la miostatina.
23. Un método según la reivindicación 22, en el que el antagonista de la miostatina es seleccionado del grupo que consiste de: un anticuerpo que se enlace con la miostatina, un ácido nucleico que hibride con un ácido nucleico que codifique la miostatina e inhiba la producción de miostatina, y un polipéptido que comprenda un propéptido de miostatina o una variante del mismo.
24. Un método según la reivindicación 19, en el que el compuesto es un antagonista de la activina.
25. Un método según la reivindicación 24, en el que el compuesto es un antagonista de una proteína activina seleccionada de la activina A, activina B, activina C y activina E.

26. Un método según la reivindicación 24 o 25, en el que el antagonista de la activina es seleccionado del grupo que consiste de: un anticuerpo que enlace con la activina y un ácido nucleico que hibride con un ácido nucleico que codifique la activina e inhiba la producción de activina.
27. Un método según la reivindicación 19, en el que el compuesto es un antagonista de GDF3.
28. Un método según la reivindicación 27, en el que el antagonista de GDF3 es seleccionado del grupo que consiste de: un anticuerpo que enlace con GDF3, un ácido nucleico que hibride con un ácido nucleico que codifique GDF3 e inhiba la producción de GDF3, y un polipéptido que comprenda un propéptido GDF3 o una variante del mismo.
29. Un método según la reivindicación 19, en el que el compuesto es un antagonista de GDF11.
30. Un método según la reivindicación 29, en el que el antagonista de GDF11 es seleccionado del grupo que consiste de: un anticuerpo que enlace con GDF11, un ácido nucleico que hibride con un ácido nucleico que codifique GDF11 e inhiba la producción de GDF11, y un polipéptido que comprenda un propéptido de GDF11 o una variante del mismo.
31. Un método según la reivindicación 30, en el que el compuesto es un antagonista de Nodal.
32. Un método según la reivindicación 31, en el que el antagonista del Nodal es seleccionado del grupo que consiste de: un anticuerpo que enlace con el Nodal, un ácido nucleico que hibride con un ácido nucleico que codifique el Nodal e inhiba la producción de Nodal, y un polipéptido que comprenda un propéptido de Nodal o una variante del mismo.

Resumen:

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a compuestos y métodos para aumentar los adipocitos termogénicos (por ejemplo, los adipocitos marrón u otros adipocitos que expresen UCP-1) por medio de la administración de un antagonista de una ruta de señalización mediada por ActRIIB. Como ejemplo de dichos antagonistas se pueden citar, entre otros, polipéptidos ActRIIB, anticuerpos ActRIIB, anticuerpos anti-miostatina, anticuerpos anti-GDF3 y anticuerpos anti-Nodal, anti-activina y anti GDF11. Una variedad de trastornos metabólicos y de otro tipo se puede tratar causando un aumento en los adipocitos termogénicos.

87

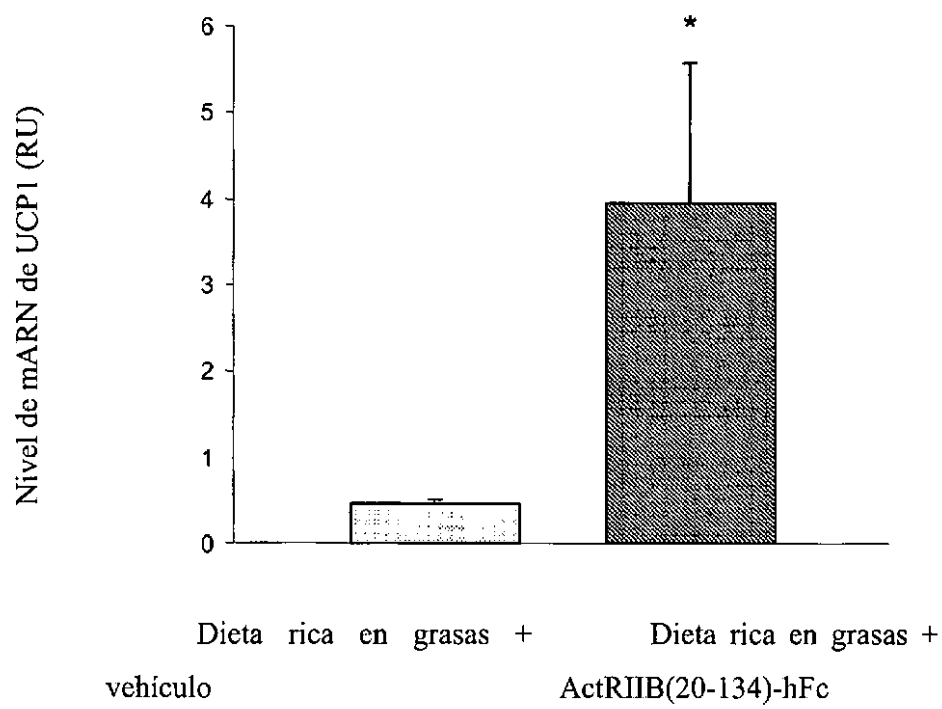


FIGURA 1

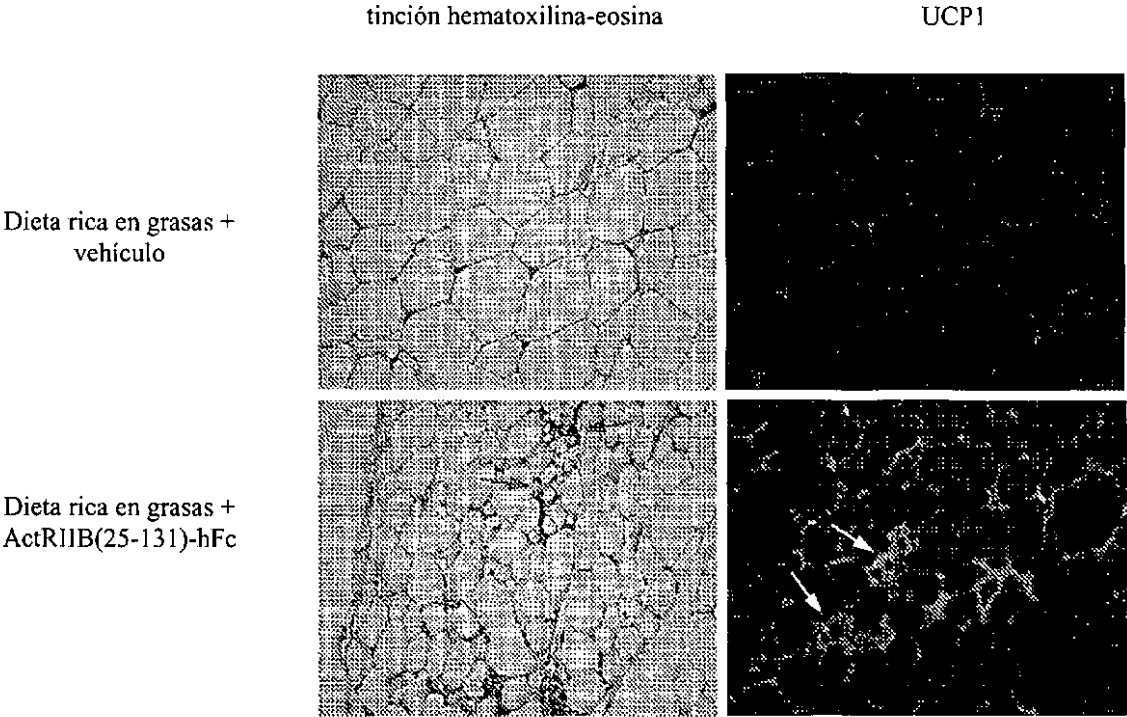


FIGURA 2

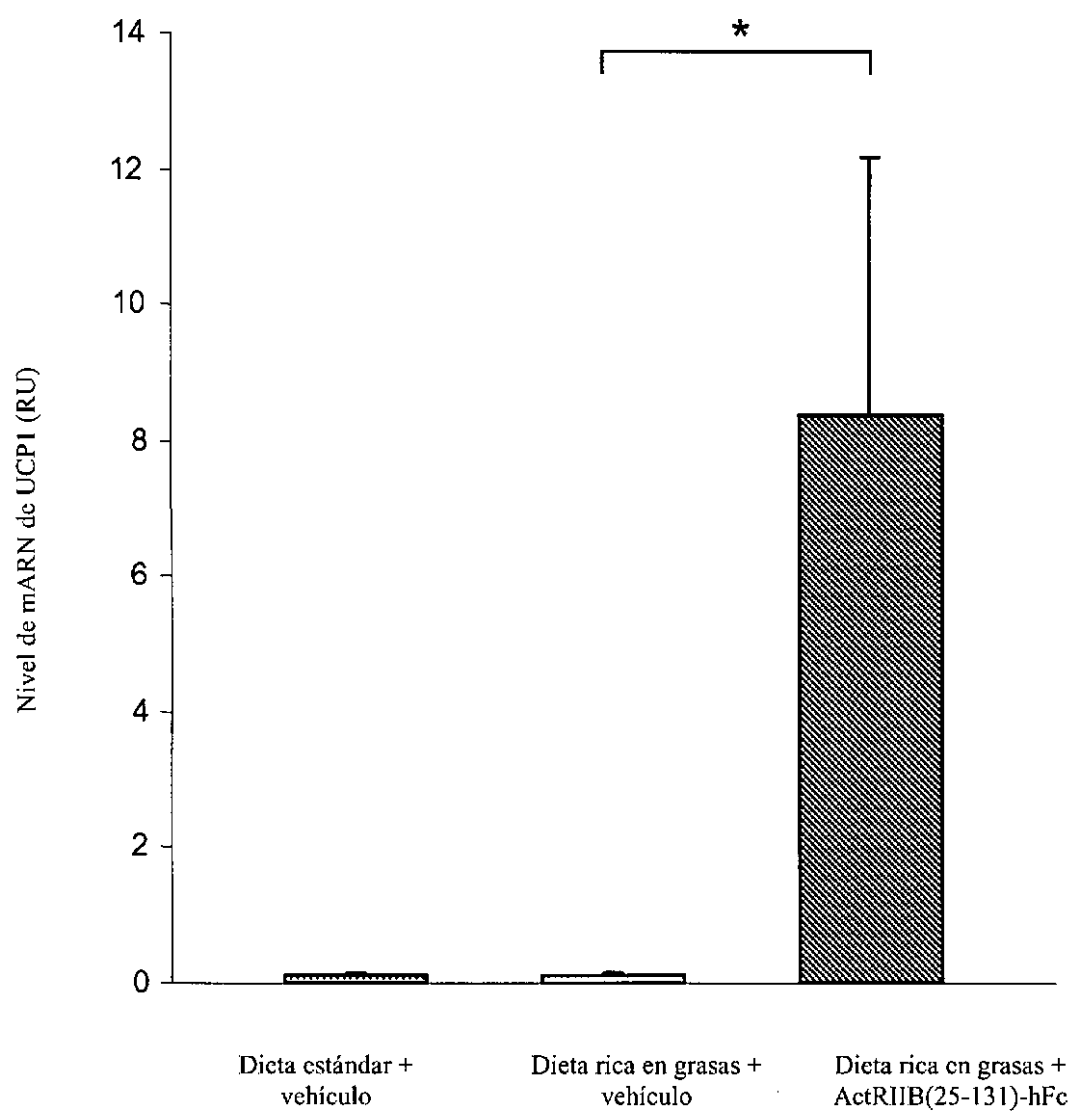


FIGURA 3

90

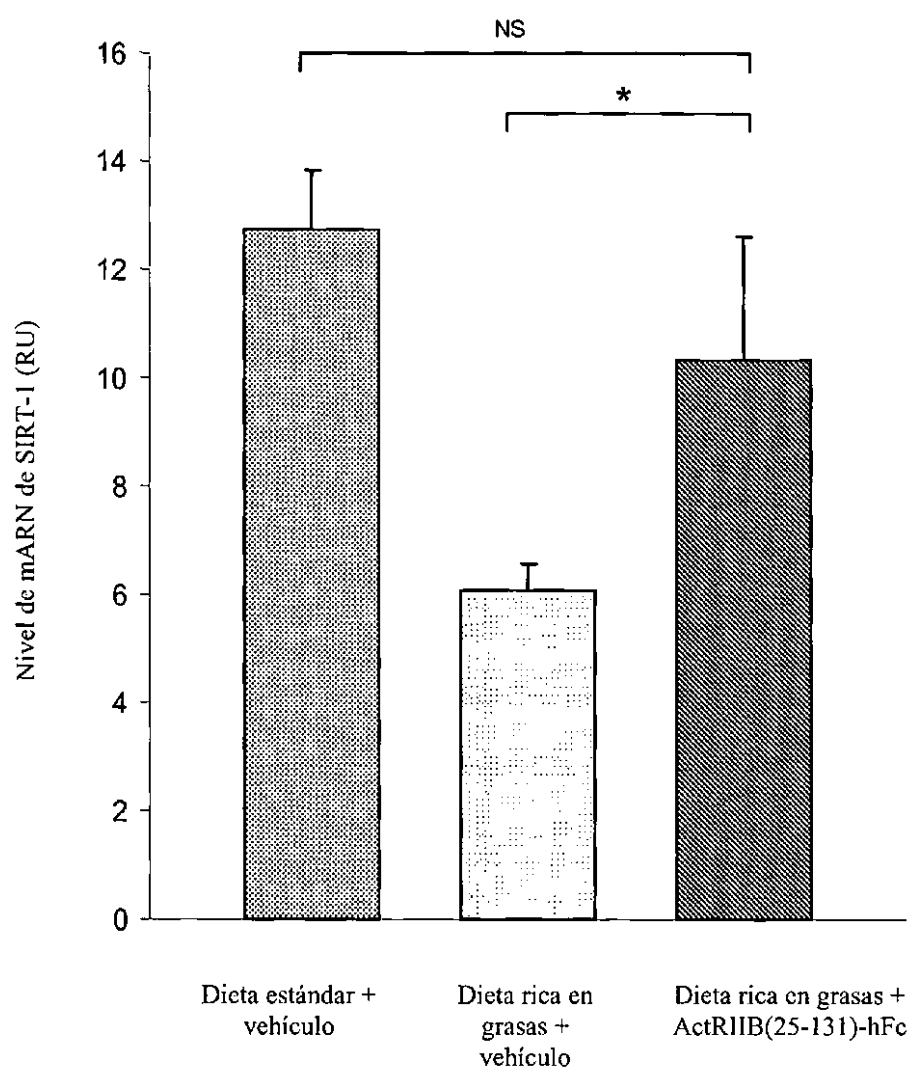


FIGURA 4

al

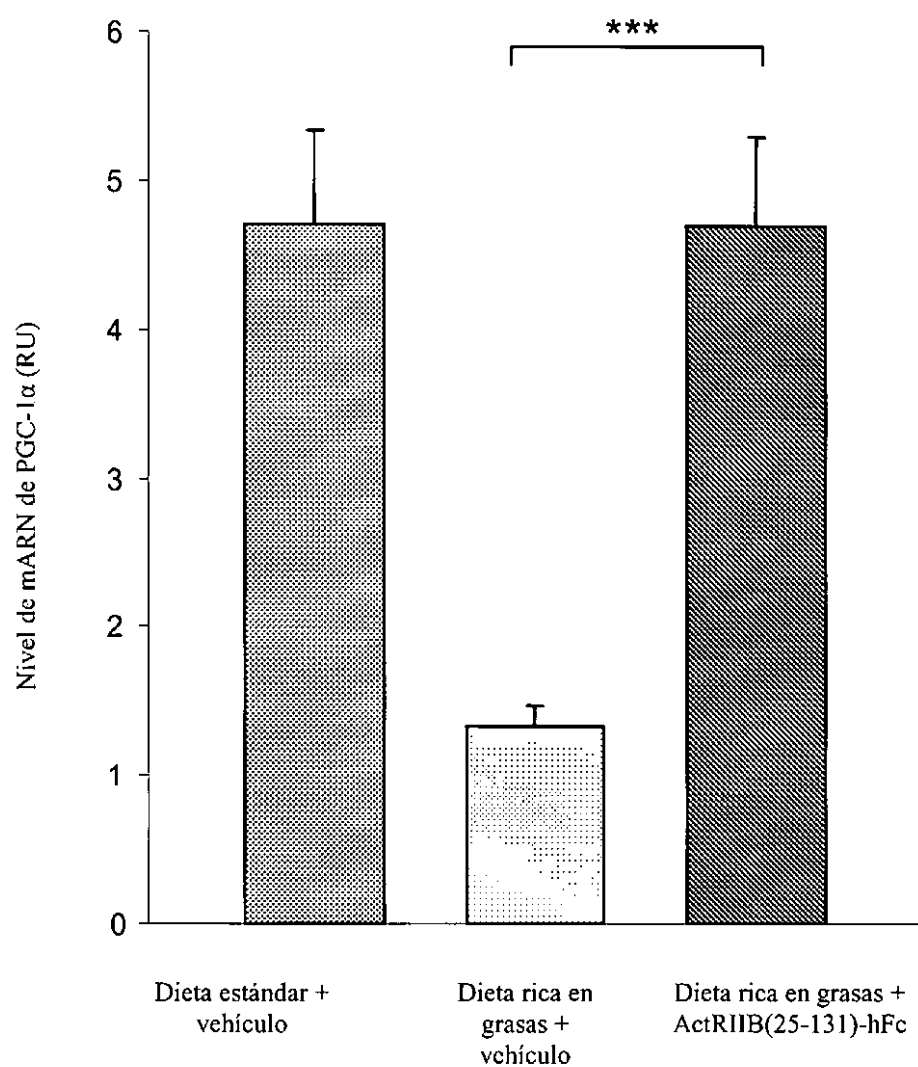


FIGURA 5

92

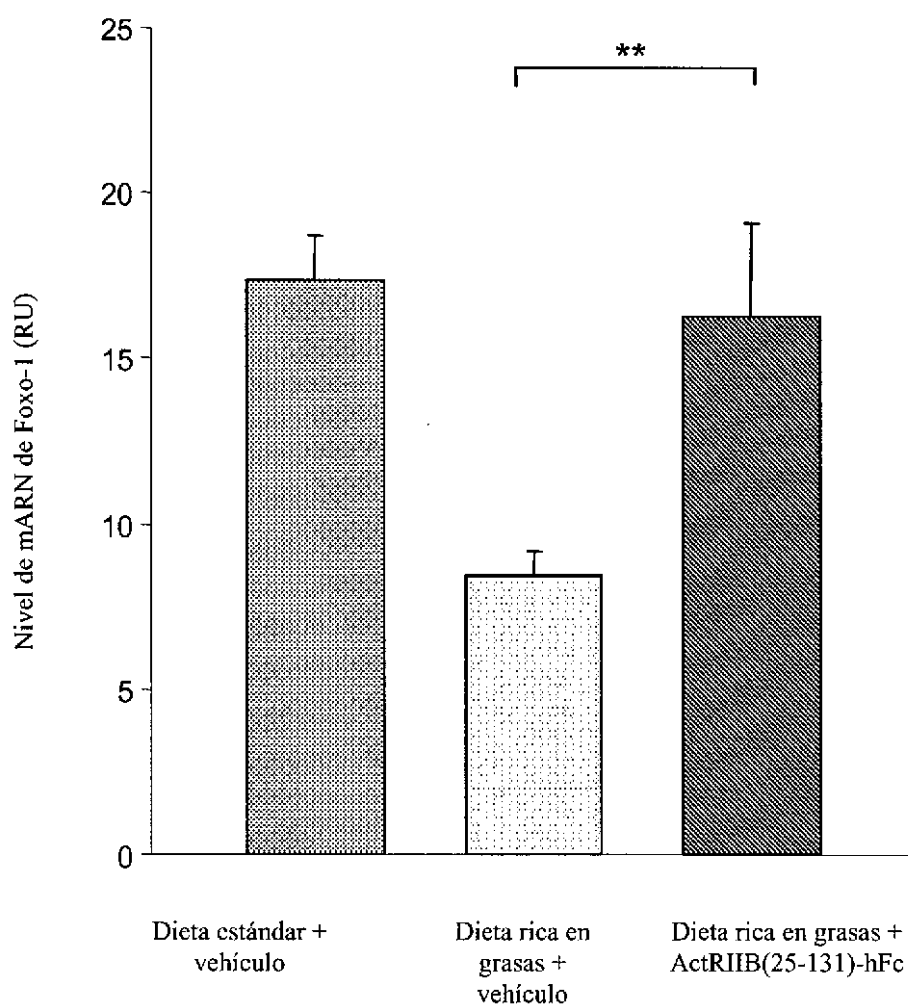


FIGURA 6

93

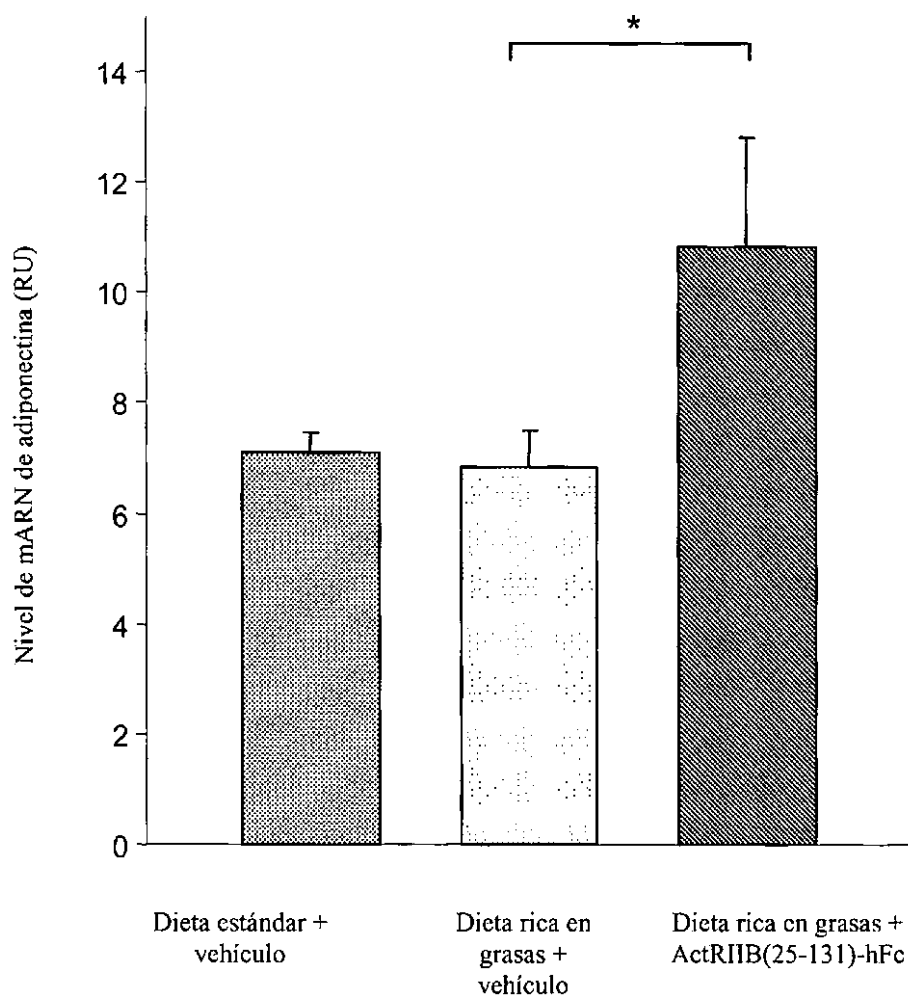


FIGURA 7

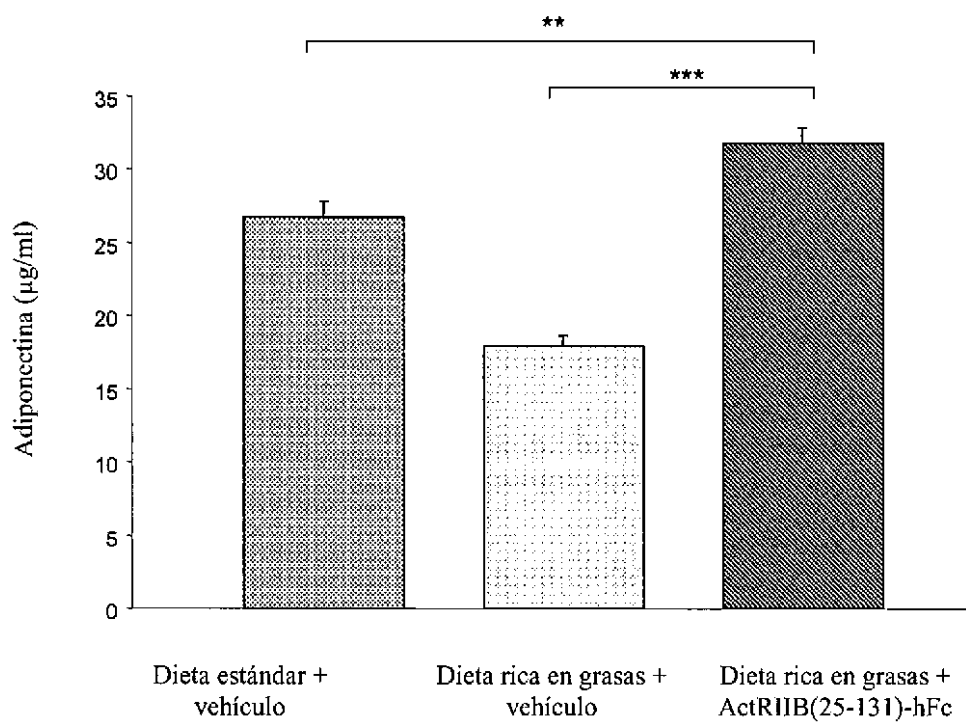


FIGURA 8

95

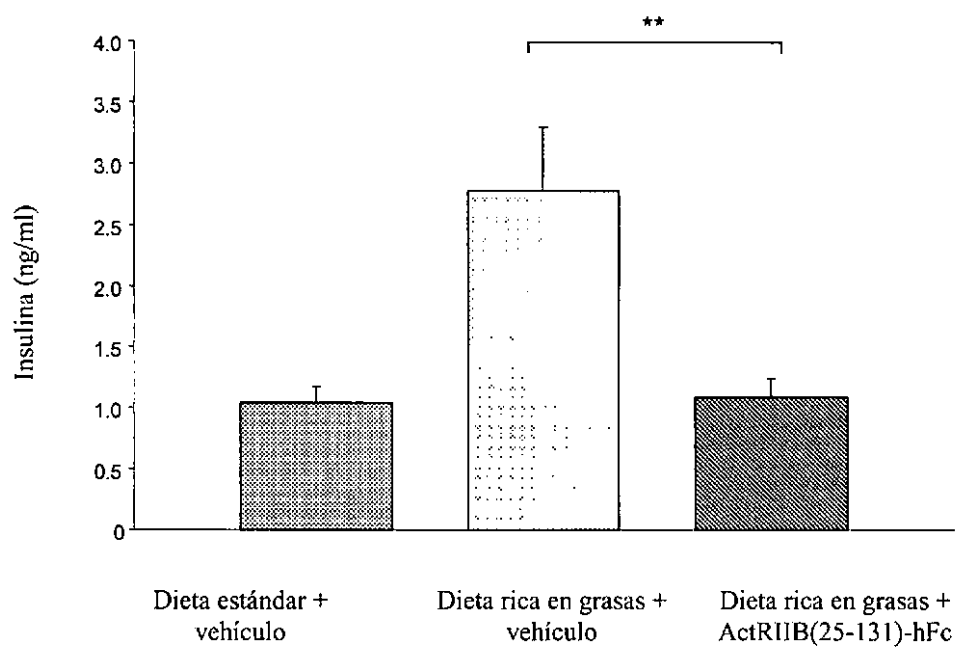


FIGURA 9

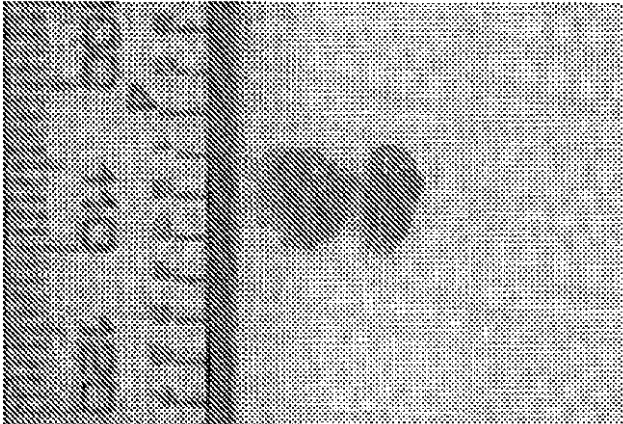
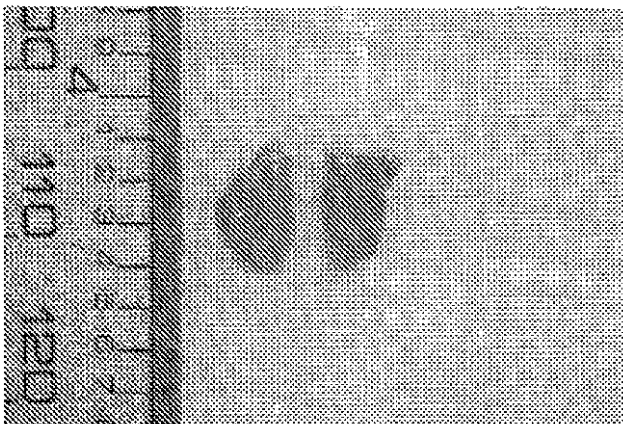
Dieta estándar + vehículo	
Dieta rica en grasas + vehículo	
Dieta rica en grasas + ActRIIB(25-131)-hFc	

FIGURA 10

97

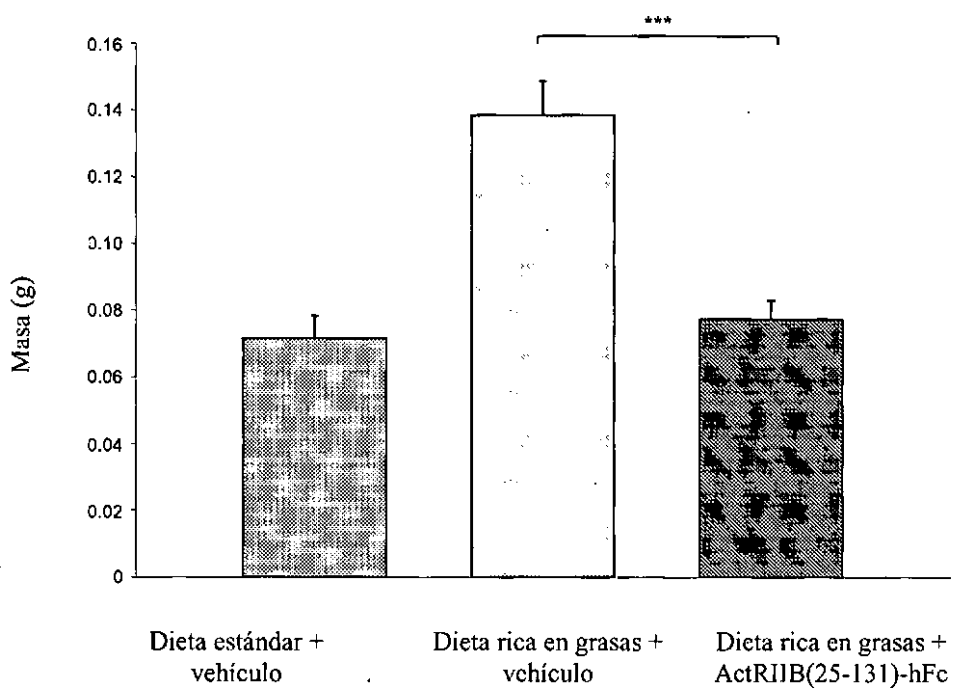


FIGURA 11

98

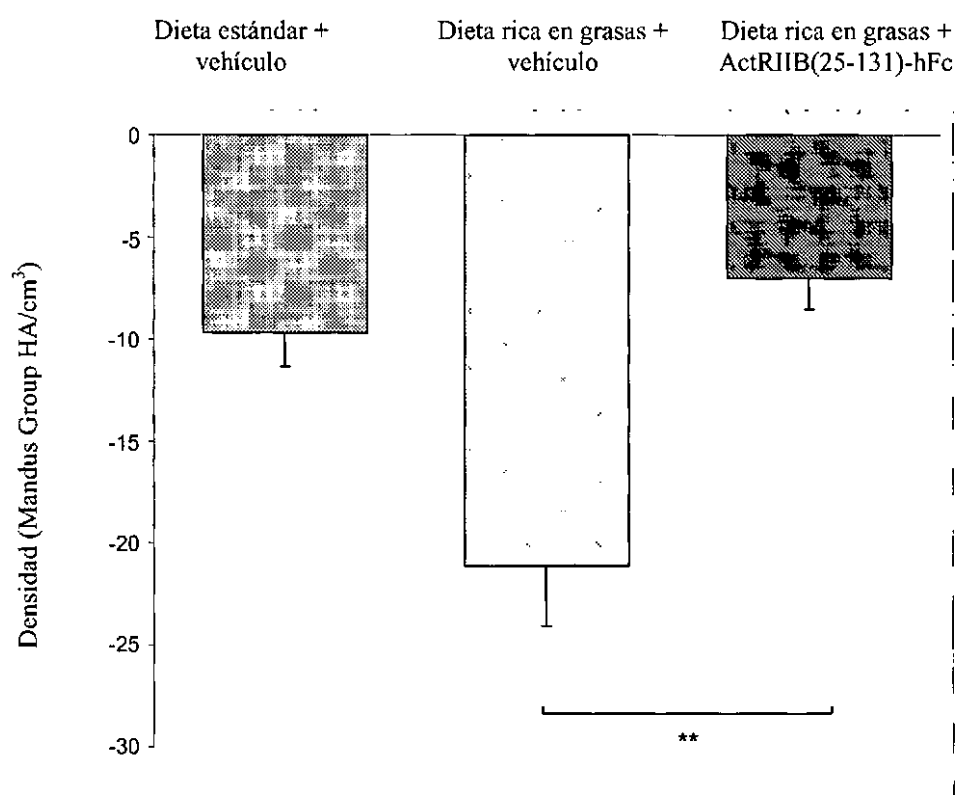


FIGURA 12

99

1	<u>MDAMKRG</u> LCC <u>VLLLCG</u> AVFV <u>SPGAA</u> ^{***} <u>ETREC</u> <u>IYYNAN</u> WELE <u>RTNQSG</u> LERC
51	<u>EGEQDK</u> RLHC <u>YASWRN</u> SSTG <u>IELVKK</u> GCWL <u>DDENCY</u> DRQE <u>CVATEEN</u> PQV
101	<u>YFCCCE</u> GNFC <u>NERFTH</u> LPEA <u>GGPEVT</u> YEPP <u>PTGGGT</u> HTCP <u>PCPAPE</u> LLGG
151	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201	KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251	KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301	ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351	QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

FIGURA 13

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

      A E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

      N A N W E L E R F N Q S G L E R C
101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGGPTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

      E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCCTCCT GGCGCAACAG
   CTTCCGCTCG TCCTGTTGCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

      S G T I E L V K K G C W L D D F
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
   GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAAGT

      N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

      Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

      P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTCGCG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

```

FIGURA 14

101

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTTCCTGGT CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 15)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 16)

FIGURA 14 (Cont.)

102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/037779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
Int. Cl.												
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPOQUE: WPI, EPODOC, MEDLINE, adipocytes, lipocyte, activin, actriib, GDF8/11/3, nodal, fat-cells SEQ 2												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	WO 2006/012627 A2 (ACCELERON PHARMA INC.) 2 February 2006	1-32										
A	WO 2004/039948 A2 (WYETH) 13 May 2004	1-32										
A	WO 2008/097541 A2 (ACCELERON PHARMA INC.) 14 August 2008	1-32										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex												
* Special categories of cited documents: <table border="0"><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 01 October 2010		Date of mailing of the international search report 08 OCT 2010										
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer JONATHAN WILKINSON AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No :										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/037779

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	2006012627	AU	2005266875	CA	2574777	EP	1771470
		US	2006068468	US	7709605		
WO	2004039948	AU	2003279817	BR	0315645	CA	2501180
		EP	1572961	JP	2010138179	MX	PA05004224
		US	2004223966	US	2008089897	US	2009087375
		US	2009087433				
WO	2008097541	AR	065169	AU	2008214375	CA	2677160
		CN	101679505	EA	200970729	EP	2125884
		MX	2009008154	US	2009005308		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference PHPH-050-WO1	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2010/037779	International filing date (day/month/year) 08 June 2010 (08.06.2010)	Priority date (day/month/year) 08 June 2009 (08.06.2009)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant ACCELERON PHARMA INC.			

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

	Date of issuance of this report 12 December 2011 (12.12.2011)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt03.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the:
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

Ropes & Gray LLP
One International Place
BOSTON
MASSACHUSETTS 02110
USA

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) 08 OCT 2010

Applicant's or agent's file reference
PHPH-050-WO1

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2010/037779

International filing date (day/month/year)
8 June 2010

Priority date (day/month/year)
8 June 2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)

Applicant

ACCELERON PHARMA INC. et al

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA
**AUSTRALIAN PATENT OFFICE
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au
Facsimile No. +61 2 6283 7999**

Date of completion of this opinion

01 October 2010

Authorized Officer
JONATHAN WILKINSON
AUSTRALIAN PATENT OFFICE
(ISO 9001 Quality Certified Service)
Telephone No.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2010/037779

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ The international application in the language in which it was filed
 - ☐ A translation of the international application into, , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2010/037779

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 1-32	YES
	Claims None	NO
Inventive step (IS)	Claims 1-32	YES
	Claims None	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-32	YES
	Claims None	NO

2. Citations and explanations:

D1 WO2006/012627 A2

D2 WO2004/0399948 A2

D3 WO2008/097541 A2

The present claims are each directed at methods for increasing thermogenic adipocytes in a patient, said method comprising administering a compound that inhibits/ antagonises the ActRIIB signalling pathway.

D1 discloses methods for modulating tissues, such as bone cartilage or fat, by the administration of ActRIIB polypeptides, or antagonist of one or more ligands of ActRII such as myostatin, GDF11, activin, or nodal. **D1** teaches that the compositions and methods disclosed therein are useful for treating diseases associated with ActRII. **D1** further discloses the polypeptide sequences of the current invention.

D2 discloses ActRIIB polypeptides and fusion molecules of the current claims for the treatment or prevention of disorders associated with muscle, bones or adipose tissues. **D2** teaches that GDF8 modulates preadipocyte differentiation to adipocytes, and that ActRIIB polypeptides bind GDF8 thereby inhibiting the activity of the ligand.

D3 discloses the use of ActRIIB polypeptides and variants, as wells as antagonists of GDF8, activin, and nodal and that these may be useful in the treatment of muscle or metabolic disorders, by promoting growth or diminishing tissue loss, exemplary tissues include muscle and fat.

NOVELTY (N)

None of the cited documents explicitly disclose a method for increasing thermogenic adipocytes as claimed and hence all the claims meet the requirements of Article 33(2) of the PCT with regard to novelty.

INVENTIVE STEP (IS)

The claimed invention is not obvious in the light of any of the cited documents nor is it disclosed in any obvious combination of them. Despite the citations disclosing the antagonists, and the polypeptides relied upon in the present claims, none of them disclose or suggest the use of these agents in relation to methods specifically aimed increasing thermogenic adipocytes. It is also considered that it would not be obvious to a person skilled in the art in the light of common general knowledge either by itself or in combination with any of these documents. Therefore the subject matter of these claims is not obvious and meets the requirements of Article 33(3) of the PCT with regard to inventive step.

..../Continued in Supplemental Box (i)

108

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International Application No.

PCT/US2010/037779

Supplemental Box (i)

Continuation of: box V

INDUSTRIAL APPLICABILITY (IA)

The invention defined in the claims is considered to meet the requirements of Industrial Applicability under Article 33(4) of the PCT because it can be made by, or used in, industry.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/268,128 08/06/2009 US 61/267,422 10/09/2009 US 61/280,545 03/11/2009 US		(51) Int Cl: C07K 014/705 (71) Solicitante(s) ACCELERON PHARMA INC. (72) Inventor(es) JOHN KNOPF Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 08/01/2012 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08/06/2010 No. de solicitud PCT/US2010/037779		(87) Publicación internacional Fecha: 16/12/2010 N° publicación: WO 2010/144452	
(54) Título: MÉTODOS PARA AUMENTAR LOS ADIPOCITOS TERMOGÉNICOS			

Resumen:

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a compuestos y métodos para aumentar los adipocitos termogénicos (por ejemplo, los adipocitos marrón u otros adipocitos que expresen UCP-1) por medio de la administración de un antagonista de una ruta de señalización mediada por ActRIIB. Como ejemplo de dichos antagonistas se pueden citar, entre otros, polipéptidos ActRIIB, anticuerpos ActRIIB, anticuerpos anti-miostatina, anticuerpos anti-GDF3 y anticuerpos anti-Nodal, anti-activina y anti GDF11. Una variedad de trastornos metabólicos y de otro tipo se puede tratar causando un aumento en los adipocitos termogénicos.

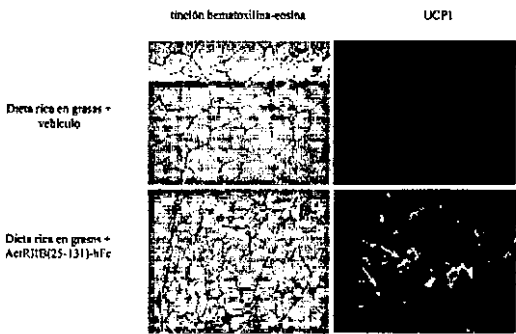


FIGURA 3

SOBRE CON ARTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000329
		Bogotá D.C., Enero 02 de 2012 - 17:19:44

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470831	02/01/2012	63.604.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			<u>\$590.000.00</u>
			=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-002090- -00000-0000
Fecha: 2012-01-06 11:26:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

Colo : 19033 - 841 - 001 - 1

112

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 126491
		Bogotá D.C., Diciembre 28 de 2011 - 11:27:04

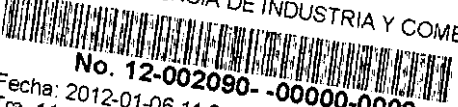
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470816	28/12/2011	19.709.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00 5.000.00
			\$5.000.00
=====			

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-002090- -00000-0000
Fecha: 2012-01-06 11:26:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

00/0: 19033 - 841 - 001 - 1

113

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 126492
		Bogotá D.C., Diciembre 28 de 2011 - 11:27:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470816	28/12/2011	19.709.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00 5.000.00
			\$5.000.00
			=====

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-002090- -00000-0000
Fecha: 2012-01-06 11:26:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

Q o / o : 19033 - 841 - 001 - 1

114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

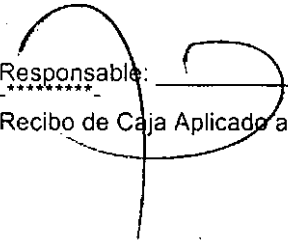
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000081
		Bogotá D.C., Enero 02 de 2012 - 11:36:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470842	02/01/2012	17.045.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00 30.000.00
			<u>\$30.000.00</u>
			=====

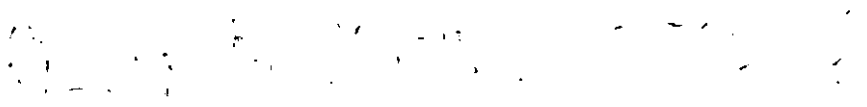
SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-002090- -00000-0000
Fecha: 2012-01-06 11:26:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

00/0: 19033 -841-001-1



115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

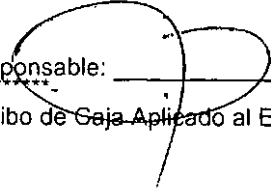
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000333
		Bogotá D.C., Enero 02 de 2012 - 17:19:44

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470831	02/01/2012	63.604.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1622 TASA ANUAL C.RECARGO A#OS 9 a 12 PARA MANTENIMINETO DE	620.000.00 620.000.00
			\$620.000.00
			=====

SON: **SEISCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-002090- -00000-0000
Fecha: 2012-01-06 11:26:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 115

Colo: 19033-841-001-1



No. 12-002090-00000-0000

Fecha: 2012-01-06 11:26:23
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 115

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art.33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐