



No. 12-004167- -00000-0000

Fecha: 2012-01-12 15:18:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PROTEINAS DE FUSION ACTRIIB-FC TRUNCADAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE ACCELERON PHARMA INC.DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS AMERICA74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-004167- -00000-0000

Fecha: 2012-01-12 15:18:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

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

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **ACCELERON PHARMA INC.**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de AméricaDirección: 128 Sidney Street,
Cambridge,
Massachusetts 02139,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: 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.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 35.456.344 T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. Jasbir SEEHRA
3 Lincoln Terrace,
Lexington,
Massachusetts 02421-6818,
Estados Unidos de América2. Ravindra KUMAR
421 Arlington Street,
Acton,
Massachusetts 01720,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2010/037787Fecha: 08 de junio de 2010Publicación Internacional No. WO 2010/151426 A1Fecha: 29 de diciembre de 2010

6

Título (54)**PROTEÍNAS DE FUSIÓN ACTRIIB-FC TRUNCADAS**

7

Clasificación Internacional (51) C07K 014/705

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

12 de junio de 2009
03 de noviembre de 2009

(31) Número de Solicitud

61/268,420
61/280,543

9

Comprobante de pago No.:12-000368

Fecha: 02 de enero de 2012

Comprobante de pago No.:12-001890

Fecha: 06 de enero de 2012

Comprobante de pago No.:12-000232

Fecha: 02 de enero de 2012

Comprobante de pago No.:11-126497

Fecha: 28 de diciembre de 2011

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 29 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$870.000.00.
- ☐ 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 2010/151426 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

AIGGATGTAA TGAAGAGAGG GGTCTGCTGT GTGCTCTGCG TGTGTGGAGC
 CAGTACGTT ACTTCTCTCC CGAGTGGACA CAGGACGAGG AAGCACTCG
 A E T R K C I Y Y
 AGTCTTGSTT TGGGCGGGG CCGGTGAGG AGGGGATTC ATCTACTAG
 TGAAGAGAA AGCGAGGCGC GGGGAGTGTG TGGGTCGAG TAGATGATGT
 N A N W E I F R T N Q E G L E R C
 AGATCAATG UGAGATGGAG CGATCAACG AGATGAGAG GAGAGATTA
 TGGGTTTAC CCGGAGGCTC GGGTGGTTGG TCTGCGGGA CCGGCGAGC
 R G R Q D K A L H C Y A S W R K S
 GAAGGGAGG AGGAGAGCG CTGCTACTTC TAGGCTCTCT GCGGAGAGC
 CTTGAGTGG TGTGTTGCG GAGCTGAGC ATGAGGAGA TCGGTTTTC
 S G T I E L V K K G C H L U D F
 CCGTGGGCG ATCGAGCTCG TGAAGAGGG CTACTGCTA GATGACTTA
 GAGAGCGGS TACTCGAGC ACTTCTTCC GAGGAGGAT CTACTGAGT
 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 ACTGCTAGA TGGGAGGAG TGTGTGGCA CTGAGGAGAA CCGGAGGTS
 TGAATGCT ATCGTCTTC AGACAGGCT GATCTCTT GCGGCTCAC
 Y F C C C E G H F C H E R F T H L
 TACTTCTCT GCTGTGAGG CACTTCTTC AAGGAGGCT TACTGATT
 ATGAGAGGA CAGCACTTC GTGAGAGG TACTGAGGA ATGAGAGAA
 P R A G G P N V T Y K E F P T
 GCGAGGCTT GGGGCGGGG AGTCACTTA CCGGAGGCG CCGAGGCTG
 CAGTCTGA CCGGAGGCG TTAGTGCTT GCTGCTGG GCTGTGAC
 GCGAGCTCA CAGATGCCA CCGTGGCGC GAGCTGACT CCGGCGGGA
 GAGCTTACT GTGTAGGCT GCGAGGCTC CTGAGTTGA GAGCGGCT
 CCGTACTCT TCTTCTTCC CCGAGAGCG AGGAGAGCG TCACTGCTC
 GCGAGTGA AGGAGAGG GGGTTTGG TCTGTTGG AGTACTAGG
 CCGGAGGCT GAGGTACAT GGTGCTGCT GAGCTGAGC CAGGAGAGC
 GCGTGGGGA CCGGAGTGA CCGGAGGGA CCGTACTCG GTGCTTCTG
 CTGAGCTAA GTTCACTCG TACTGAGC GGTGAGGT GCGATGCTC
 GAGTCACTT CAGTTGAGC ATGAGCTTC CAGCTGCA CCGATTAGG
 AGGAGAGC CCGGAGGGA GAGTCACT AGGAGTTC GTGCTGCTC
 TCTGTTTC GCGGCTCTT CCGGAGTTC TCGGAGTTC CAGGAGTTC
 GGTGCTGCT GGTGCTGCT AGGAGTTC GAGTGGAG GAGGAGTTC
 CAGGAGTTC GAGGAGTTC TCGGAGTTC CAGGAGTTC CAGGAGTTC
 GCGGAGTTC CAGGAGTTC GGTGCTGCT CCGGAGTTC CAGGAGTTC
 CCGGAGTTC GGTGCTGCT GGTGCTGCT CCGGAGTTC CAGGAGTTC
 AAGGAGTTC GGTGCTGCT GGTGCTGCT CCGGAGTTC CAGGAGTTC
 TCGGAGTTC GGTGCTGCT GGTGCTGCT CCGGAGTTC CAGGAGTTC

FIGURA 2

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia Gadea
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/151426 A1

Descripción:

Páginas 76 en español

Reivindicaciones: Número (s) 39

Figuras: Número (s) 32

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ **Forma PCT/IB/306**. Notificación de la supresión del señor John Knopf como inventor.
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
29 December 2010 (29.12.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/151426 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/705 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2010/037787
- (22) International Filing Date:
8 June 2010 (08.06.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/268,420 12 June 2009 (12.06.2009) US
61/280,543 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
(73) Inventors/Applicants (for US only): **KNOPE, John** [US/US]; 147 Robbins Drive, Carlisle, MA 01741 (US). **SEEHRA, Jasbir** [US/US]; 3 Lincoln Terrace, Lexington, MA 02421-6818 (US). **KUMAR, Ravindra** [US/US]; 421 Arlington Street, Acton, MA 01720 (US).
- (74) Agents: **WARMA, Anita et al.**; Ropes & Gray LLP, Prudential 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,

[Continued on next page]

(54) Title: TRUNCATED ACTRIIB-FC FUSION PROTEINS

```
1  ATGATGATTA  TGAAGGAGG  GTTGGCTCTT  GGTGTCTCTC  TGTGTGAGG
   TGGCTAGCTT  TCTTCTCTCT  CAGAGGAGG  CAGAGGAGG  AGAGGCTCTG
                                     A E T R E C I V Y
51  AGCTTCGTT  TGGCGGGG  CGGTGAGG  AGGAGAGG  ACTACTAGA
   TCAAGAGCA  AGCGGGGCG  GCGAGCTCG  TGGCTCAG  TAGATGAT
   N A H N E L E R T F G S G L E R C
101  AGGCTACTG  GAGAGGGG  CCGAGCAG  AGAGGCGCT  GAGAGCTCG
   TGGGTGAG  CCGAGCTCT  GGTGTCTG  TGTGGGGA  CCGAGAGG
   F G E Q D K R L H C Y A S R R R S
151  GAGGCGAG  AGGAGAGG  GGTGAGCT  TGGCTCTCT  GCGAGAGG
   CTTGCGCT  TGTGTCTG  CAGAGGAG  AGGAGAGG  AGGAGAGG
   S G T I E L V K R G U W L D D F
201  CCGAGCTCT  AGGAGAGG  TGAAGAGG  CCGAGCTCT  GAGAGCTCT
   GAGAGCTCT  TGGGTGAG  AGGAGAGG  GAGAGAGG  GAGAGAGG
   N C Y D R E C V A T E E N P Q V
251  ACTGAGCA  TGGAGAGG  TGTGAGCA  CAGAGAGG  CCGAGAGG
   TGGAGCTCT  AGGAGAGG  AGAGAGG  GAGAGAGG  GAGAGAGG
   Y T C C C E S W C H E R T T E L
301  TACTGAGCT  GGTGTCTCT  CAGAGCTCT  AGGAGAGG  TGGAGCTCT
   AGAGAGCA  CAGAGCTCT  GTTGTGAG  TGTGTGCA  AGAGAGCA
   P E A G G P E V T Y E P P P T
351  GAGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG
   CCGAGCTCT  CCGAGAGG  TGGAGCTCT  GGTGTGAG  GGTGTGAG
401  GGTGAGCT  CAGAGCTCT  CCGAGAGG  CAGAGAGG  CCGAGAGG
   CAGAGCTCT  GGTGTGAG  CCGAGAGG  GGTGAGCT  GGTGAGCT
451  CCGAGCTCT  TGTGTGAG  CCGAGAGG  AGGAGAGG  TGTGTGAG
   GAGAGAGG  AGGAGAGG  GGTGTGAG  TGTGTGAG  AGGAGAGG
501  CCGAGCTCT  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  CCGAGAGG
   GGTGTGAG  CCGAGAGG  CCGAGAGG  CCGAGAGG  GGTGTGAG
551  CCGAGCTCT  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG
   GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG
601  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG
   TGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG
651  GGTGTGAG  GGTGTGAG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  GGTGTGAG
   GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG
701  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG
   GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG
751  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG  AGGAGAGG
   TGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  GGTGTGAG  AGGAGAGG
```

FIGURE 2

(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions comprising polypeptides that are derived from ActRIIB for modulating (promoting or inhibiting) growth of a tissue, such as bone, cartilage, muscle, fat, brown fat and/or neuronal tissue and for treating metabolic disorders such as diabetes and obesity, as well as disorders associated with any of the foregoing tissue.

WO 2010/151426 A1

WO 2010/151426 A1

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, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

PROTEÍNAS DE FUSIÓN ACTRIIB-FC TRUNCADAS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional para Estados Unidos con No. de Ser. 617268,420, presentada el 12 DE junio de 2009, la 61/280,543 presentada el 3 de noviembre de 2009. Éstas se incorporan al presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

La súper-familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la súper-familia desempeñan funciones importantes durante el desarrollo del embrión en formación de patrones y especificación de tejidos y pueden ejercer influencia en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, mio-génesis, condro-génesis, cardio-génesis hematopoyesis, neuro-génesis y diferenciación de células epiteliales. La familia está representada por proteínas llamadas, diversamente, las activinas e inhibinas, TGF-beta, Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF) y Factores Morfo-genéticos de Hueso (BMPs). Se conocen otros miembros de la familia tales como Nodal y Lefty. Al manipular la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, con frecuencia es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ej., las razas de ganado Piamonteses y Belgian Blue llevan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamada miostatina) que causa una marcada influencia en la masa muscular. Grobet, et. Al, Nat. Genet. 1997, 17(1):71-4. En humanos, además, los alelomorfos inactivos de GDF8 se asocian con incremento de la masa muscular y, según se reporta, con fortaleza excepcional. Schuelke et al, N. Engl. J Med 2004, 350:2682-8.

Los cambios en músculos, grasa, cartílago y otros tejidos pueden realizarse por señalización agonista o antagonista que está regulada por un miembro adecuado de la familia TGF-beta. Así, existe la necesidad de agentes que funcionen como reguladores potentes de señalización por miembros de la super-familia de TGF-beta.

RESUMEN DEL INVENTO

Bajo ciertos aspectos, esta revelación provee nuevos polipéptidos ActRIIB en particular truncamiento de terminales amino y carboxilos y alteraciones de secuencia. En una incorporación, se describen los polipéptidos incluyendo los amino-ácidos 25-131 del ActRIIB humanos (SEQ ID NO:1) o sus variantes. Tales polipéptidos han demostrado tener sorprendente eficacia en el tratamiento de una variedad de desórdenes, pero especialmente en aquellos desórdenes asociados con la obesidad, resistencia a la insulina y otros desórdenes metabólicos. Los polipéptidos ActRIIB revelados en el presente se pueden utilizar para que tengan una variedad de efectos deseables en pacientes, incluyendo, por ej., aumento de la masa corporal magra, disminución del tejido adiposo blanca, incremento del tejido adiposo marrón, disminución de los triglicéridos de suero, disminución de los niveles de suero en insulina o disminución de los niveles de suero de ácido graso libre. Los polipéptidos ActRIIB revelados en el presente pueden ser utilizados para el tratamiento de una variedad de desórdenes o condiciones, incluyendo desórdenes musculares y neuromusculares (por ej., distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular), desórdenes del tejido adiposo (por ej., obesidad, enfermedad grasa del hígado) desórdenes metabólicos por ej., diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, síndrome metabólico), desórdenes neurodegenerativos y desgaste muscular asociado con vejez (sarcopenia), terapia para cáncer de próstata (por ej., terapia de carencia de andrógenos) y caquexia asociada con una variedad de cánceres. Ejemplos de polipéptidos ACTRIIB incluyen una proteína de fusión humana ActRIIB-Fc indicada en SEQ ID NO:8 y descrita aquí como ActRIIB(25-131)-hFc.

Bajo ciertos aspectos, la revelación provee poli-péptidos nuevos que se derivan del ActRIIB (llamados poli-péptidos ActRIIB). En algunas incorporaciones, se puede seleccionar un poli-péptido del grupo que consiste de: un poli-péptido que tiene una secuencia de aminoácido, donde la secuencia de aminoácido consiste en la secuencia de SEQ ID NO:8 o una secuencia de aminoácido que difiere de SEQ ID NO:8 en no más de una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones de aminoácidos; un poli-péptido producido por la expresión de una célula mamífera del ácido nucleico de SEQ ID NO:4 o un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones astringentes al complemento de éste; un poli-péptido revelado en el presente puede incluir una porción derivada del ActRIIB y una o más porciones heterólogas, donde la porción derivada del ActRIIB puede incluir una secuencia de aminoácido consistente en la secuencia de 25-131 de SEQ ID NO:1 de amino-ácido o una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia SEQ ID NO:1 de aminoácidos a no más de una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones de aminoácidos. La porción heteróloga puede incluir un dominio constante de inmunoglobulina, un dominio Fc de una inmunoglobulina o, en especial, un dominio Fc de un IgGI humano (el término "IgGI humano" se entenderá como que incluye variaciones de tal Fc que sean compatibles para uso en humanos). Los poli-péptidos ActRIIB pueden incluir una porción derivada de un ActRIIB que incluye una secuencia de aminoácidos consistente en la secuencia 25-131 de SEQ ID NO:1 de aminoácidos. Un poli-péptido ActRIIB revelado en este puede ser tal que el terminal amino tiene la secuencia ETR. Un poli-péptido ActRIIB revelado en este puede causar un incremento significativo estadísticamente en la masa corporal magra de un ratón luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10mg/kg. El incremento promedio de masa de tejido magro puede ser por lo menos de 1, 2, 3, 4 o 5 o más gramos. Un poli-péptido ActRIIB revelado en el presente puede causar una disminución significativa estadísticamente en la masa grasa de un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg. La disminución promedio de masa grasa puede ser de 5, 7, 10, 15 o más gramos. Un poli-péptido de ActRIIB revelado en el presente puede causar una disminución

significativa estadísticamente en niveles de triglicéridos de suero en un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg. El promedio de disminución de triglicéridos de suero puede ser de por lo menos 50, 75, 100, 125 o 150 o más mg/dl. Un poli-péptido de ActRIIB revelado en el presente puede causar una disminución significativa estadísticamente en niveles de ácido graso libre de suero en un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg. El promedio de disminución de ácido graso libre de suero puede ser de por lo menos 500, 750, 1000, o más micro-moles/dl de ácidos grasos libres. Un poli-péptido de ActRIIB revelado en el presente puede causar una disminución significativa estadísticamente en niveles de insulina de suero en un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg. El promedio de disminución de insulina de suero puede ser de por lo menos 0,5, 1, 1,5, 2 o más ng/ml de insulina. Como se está utilizando en este, el término "significativo estadísticamente" se refiere generalmente a un valor P o >0.05 , pero otras medidas significativas pueden reconocerse por medio de diferentes clases de exámenes estadísticos y, en tales casos, el término "significativo estadísticamente" debería utilizar una más amplia fórmula para evaluar el significado de los datos. Un poli-péptido ActRIIB puede incluir por lo menos un azúcar con vínculo-N y puede incluir dos, tres o más, azúcares con vínculo-N. Tales poli-péptidos también pueden incluir azúcares con vínculo-O. Los poli-péptidos ActRIIB pueden producirse en una variedad de líneas de células que glucosilan la proteína de tal manera que son aptas para uso en pacientes, incluidas las células manipuladas de insectos o de almidón, y células de los mamíferos tales como células COS, células CHO, células HEK y células NSO. Los poli-péptidos ActRIIB pueden formar dímeros covalentes o no covalentes, incluyendo homo-dímeros. Generalmente las proteínas de fusión Fc tienden a formar homo-dímeros que se unen covalentemente. Cualquiera de los anteriores poli-péptidos puede ser incorporado a una preparación farmacéutica.

Bajo ciertos aspectos, los poli-péptidos ActRIIB revelados en el presente se unen a un ligando tales como GDF8, GDF11, activina, BMP7, GDF3 o nodal. Opcionalmente, un poli-péptido unido a un ligando ActRIIB con un Kd menos que 10 micromolares o menos de 1 molar, 100, 10, 1 o 0,1 nanomolar. Un poli-péptido ActRIIB revelado en el presente puede incluir uno, dos, tres, cuatro o más alteraciones en la secuencia de los aminoácidos (por ej. en el dominio de la unión-ligando) relativa a un poli-péptido ActRIIB que ocurre naturalmente. La alteración en la secuencia del aminoácido puede, por ej., alterar la glicosilación del poli-péptido cuando se produce en una célula mamífera, de insecto u otra eucariótica, o altera la segmentación proteolítica del poli-péptido relativa al poli-péptido ActRIIB que ocurre naturalmente. Un poli-péptido ActRIIB puede ser una proteína fusión que tiene, como dominio, una secuencia de aminoácidos derivada del ActRIIB (por ej., un dominio de unión-ligando de una ActRIIB o una variante de ésta) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como fármacos cinéticos mejorados, más fácil purificación, enfoque en tejidos especiales, etc., por ej., el dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más estabilidad en vivo, media vida in vivo, captación/administración, localización o distribución de tejido, formación de complejos de proteína, multimerización de la proteína de fusión, y/o purificación. Una proteína de fusión ActRIIB puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo silvestre o mutante) o una albúmina de suero. En algunas incorporaciones, una fusión ActRIIB incluye un ligador no estructurado posicionado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIB. Este ligador no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aminoácido 15 en el final de la terminal C 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 están relativamente libres de estructuras secundarias. Un ligador puede ser rico en residuos de glucina y prolina y puede, por ej., contener secuencias repetidas de treonina/serina y glucinas (por ej., repeticiones de TG₄ o SG₄). En el contexto de un poli-péptido de SEQ ID NO[®] parece que es ventajoso utilizar un ligador corto, flexible tal como uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de glucina,

opcionalmente con uno o más residuos pequeños de alanina, treonina o serina. Una proteína de fusión puede incluir una sub-secuencia de purificación como un marcador epítipo, un marcador FLAG, una secuencia poli-histidina y una secuencia de fusión GST. Opcionalmente, un poli-péptido ActRIIB incluye uno o más residuos modificados de aminoácidos escogidos de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilato, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una mitad de lípido y un aminoácido conjugado con un agente orgánico derivativo.

Bajo ciertos aspectos, un poli-péptido ActRIIB puede ser formulado como preparación farmacéutica. Una preparación farmacéutica preferiblemente será libre de pirógenos (significando libre de pirógenos a la medida requerida por las reglas que rigen la calidad de los productos para uso terapéutico). Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos tales como un compuesto que se utiliza para tratar un desorden asociado con ActRIIB.

Bajo ciertos aspectos, la revelación suministra aminoácidos codificando un poli-péptido de ActRIIB. Tal ácido nucleico puede incluir una secuencia de ácido nucleico de 73-396 de SEQ ID NO:4 o una que se hibrida bajo condiciones astringentes al complemento de los nucleótidos 73-396 de SEQ ID NO:4. Un ácido nucleico puede ser uno que incluye una secuencia de SEQ ID NO:4. Tal ácido nucleico puede incluir una secuencia de 73-396 de SEQ ID NO:6 o una que se hibrida bajo condiciones astringentes al complemento de los nucleótidos 73-396 de SEQ ID NO:6. Un ácido nucleico puede ser uno que incluye una secuencia SEQ ID NO:6. En algunos aspectos una proteína ActRIIB puede expresarse en una línea celular mamífera que regula apropiadamente la glicosilación natural de la proteína ActRIIB para disminuir la posibilidad de que haya una respuesta inmunológica poco favorable en un paciente (incluyendo la posibilidad de pacientes veterinarios). Las líneas celulares humanas y de CHO se han utilizado con éxito y se espera que otros vectores de expresiones de los mamíferos comunes sean útiles. Así, la revelación proporciona células en cultivo que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos revelados en el presente.

Dichas células pueden ser de los mamíferos, incluyendo células CHO, células NSO, células HEK y células COS. Se pueden escoger otras células dependiendo de la especie del paciente a tratar. Se revelan otras células en este. Las células en cultivo se entiende que son células que se mantienen en un laboratorio u otras condiciones hechas por el hombre (como congeladas o en algún medio) y que no son parte de un organismo vivo.

Bajo ciertos aspectos, la revelación suministra métodos para hacer un poli-péptido de ActRIIB. Tal método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ej. SEQ ID NO:4 o 6 y ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones astringentes) que se revelan aquí en una célula apropiada, tal como el ovario de un hámster Chino, célula (CHO). Tal método puede incluir a) cultivo de una célula bajo condiciones aptas para expresión del poli-péptido ActRIIB. Donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de ActRIIB; y b) restaurando el poli-péptido ActRIIB así expresado. Los poli-péptidos ActRIIB pueden restaurarse como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas utilizando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteína de cultivos de células así como de las técnicas descritas en éste.

Bajo ciertos aspectos, la revelación suministra métodos para tratar a un individuo que tiene un desorden asociado con pérdida de músculo o crecimiento insuficiente de músculo. Tal método puede incluir la administración al individuo de una cantidad efectiva de cualquiera de los poli-péptidos de ActRIIB precedentes o preparaciones farmacéuticas de este.

Bajo ciertos aspectos, la revelación proporciona métodos para incrementar la masa magra o reducir la tasa de pérdida de la masa magra en un individuo que la necesite. Tal método puede incluir la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de los poli-péptidos ActRIIB anteriores o preparaciones farmacéuticas de este.

Bajo ciertos aspectos, la revelación proporciona métodos para disminuir el contenido de grasa corporal o reducir la tasa de incremento del contenido de grasa corporal en un sujeto. Tal método puede incluir la administración de una cantidad

efectiva de cualquiera de los poli-péptidos ActRIIB anteriores o preparaciones farmacéuticas de este.

Bajo ciertos aspectos, la revelación proporciona métodos para tratar un desorden asociado con la no deseada ganancia de peso en dicho sujeto. Tal método puede incluir la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de los poli-péptidos ActRIIB anteriores o preparaciones farmacéuticas de este.

Bajo ciertos aspectos, la revelación proporciona métodos para el tratamiento de un desorden metabólico en un sujeto. Tal método puede incluir la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de los poli-péptidos ActRIIB anteriores o preparaciones farmacéuticas de este al sujeto. Un paciente elegible para tratamiento puede tener una o más de las siguientes características: niveles elevados de suero triglicérido, niveles elevados de ácidos grasos libres o niveles elevados de suero de insulina. Los ejemplos de desórdenes metabólicos incluyen diabetes tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y obesidad.

Bajo ciertos aspectos, la revelación en este de un polipéptido ActRIIB puede ser utilizado en un método para tratar a un sujeto que tiene un desorden asociado con pérdida de músculo o crecimiento insuficiente de músculo. Tales desórdenes incluyen la atrofia muscular, la distrofia muscular, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y un desorden de desgaste muscular del músculo (p.ej. caquexia, anorexia, síndrome de DMD, síndrome BMD, síndrome de desgaste por SIDA, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares, enfermedades de las neuronas motoras, enfermedades de las uniones neuromusculares y miopatías inflamatorias). Un método puede incluir la administración de una cantidad efectiva de los poli-péptidos ActRIIB al sujeto con esta necesidad.

Bajo ciertos aspectos, la revelación en este de un polipéptido ActRIIB puede ser utilizado en un método para reducir el contenido de grasa corporal o reducir la tasa de incremento del contenido de grasa corporal y para tratar un desorden asociado con ganancia de peso no deseada, tales como la obesidad, diabetes mellitus no dependiente de insulina

(NIDDM), enfermedad cardiovascular, cáncer, hipertensión, osteoartritis, derrames, problemas respiratorios y enfermedad de la vesícula. Estos métodos pueden incluir la administración de una cantidad efectiva de los poli-péptidos ActRIIB al sujeto con esta necesidad.

Bajo ciertos aspectos, la revelación en este de un poli-péptido ActRIIB puede ser utilizado en un método para tratar un desorden asociado con la actividad anormal del GDF8. Tales desórdenes incluyen los metabólicos, tales como la diabetes tipo 2, pobre tolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (por ej. Síndrome X) y resistencia a la insulina inducida por trauma (por ej. quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); desórdenes del tejido adiposo (por ej. obesidad); distrofia muscular (incluyendo la distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ELA; atrofia muscular; atrofia de órganos; debilidad; síndrome del túnel del carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; sarcopenia, caquexia y otros síndromes de debilidad muscular; osteoporosis, osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia, osteoartritis, fracturas relacionadas con osteoporosis; poca masa ósea por terapia crónica de glucocorticoides; falla gonadal prematura; supresión de andrógeno, deficiencia de vitamina D; hipoparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nervosa. El método puede incluir la administración de una cantidad efectiva de los poli-péptidos ActRIIB al sujeto con esta necesidad.

Bajo ciertos aspectos, la revelación en este proporciona un método para identificar un agente que estimule el crecimiento de un tejido tal como hueso, cartílago, músculo y grasa. El método incluye: a) identificar un agente de examen que se vincule a un dominio de unión-ligando de un poli-péptido ActRIIB competitivamente con un poli-péptido ActRIIB; y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento del tejido.

Bajo ciertos aspectos, la revelación en este proporciona un método para antagonizar la actividad de un poli-péptido ActRIIB o un ligando de un poli-péptido ActRIIB (por ej., GDF8, GDF11; activina, GDF3, BMP7 y Nodal) en una célula. Los métodos incluyen el contacto de la célula con un poli-péptido

ActRIIB. Opcionalmente, la actividad del poli-péptido ActRIIB o del ligando ActRIIB está monitoreado por una transducción de señalización regulada por el complejo ActRIIB/ligando ActRIIB, por ej., monitoreando la proliferación de las células. Las células de los métodos incluyen un osteoblasto, un condrocito un miocito, un adipocito y una célula muscular.

Bajo ciertos aspectos, la revelación proporciona el uso de un poli-péptido ActRIIB para fabricar un medicamento para el tratamiento de un desorden o condición como se describe en éste.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la plena secuencia sin procesamiento del aminoácido para el ActRIIB(25-131)-hFC (SEQ ID NO:3). El líder TPA (residuos 1-22) y el doble truncamiento del dominio extracelular ActRIIB (residuos 24-131, utilizando la numeración basada en la secuencia nativa en SEQ ID NO:1) cada una de ellas subrayadas. El glutamato revelado por la secuencia del terminal-N de aminoácido de la proteína de la fusión, que está en la posición 25 relativa a la SEQ ID NO:1 está destacada.

La **Figura 2** muestra una secuencia del nucleótido codificando ActRIIB(25-131)-hFc (la línea de código se muestra arriba, SEQ ID NO:4, y el complemento se muestra abajo 3'-5', SEQ ID NO:5). Las secuencias codificando el líder TPA (nucleótidos 1-66) y dominio extracelular ActRIIB (nucleótidos 73-396) están subrayados. La secuencia correspondiente de aminoácidos para ActRIIB(25-131) también se muestra.

La **Figura 3** muestra una secuencia alternativa de nucleótido codificando ActRIIB(25-131)-hFc (la línea de código se muestra arriba, SEQ ID NO:6 y el complemento se muestra abajo 3'-5', SEQ ID NO:7). Esta secuencia confiere un nivel más alto de expresión de proteína en los transformantes iniciales. Haciendo que el desarrollo de la línea de células sea un proceso más rápido. Las secuencias codificando el líder TPA (nucleótidos 1-66) y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 73-396) están subrayados y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre del ECD (ver **Figura 2**) se realzan. También se

muestra la secuencia correspondiente al aminoácido para ActRIIB(25-131).

La **Figura 4** muestra el efecto de cuatro semanas de tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc en tejido de grasa magra en un ratón. El vehículo fue de solución salina amortiguada (tamponada) con Tris (Tris-buffered saline-TBS). La información es promedio (n=10 por grupo) $\pm$ SEM. **, $P < 0.01$ vs TBS por examen-t sin par. El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc aumentó el tejido de la masa magra de manera dependiente de una dosis clara.

La **Figura 5** muestra el efecto de cuatro semanas de tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc en la masa muscular del pectoral del ratón. El vehículo fue de solución salina amortiguada con tris (TBS). La información es promedio (n=10 por grupo) $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs TBS por examen-t sin par. El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc aumentó el tejido de la masa muscular del pectoral de manera dependiente de una dosis clara.

La **Figura 6** muestra el efecto de ActRIIB(25-131)-hFc en la fuerza de agarre del ratón. El vehículo fue de solución salina amortiguada con Tris (TBS). La información es promedio (n=10 por grupo). **, $P < 0.01$ vs TBS por examen-t sin par. El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc aumentó la fuerza de agarre de manera dependiente de la dosis.

La **Figura 7** muestra el efecto de cuatro semanas de tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc en tejido de grasa magra en un ratón modelo de carencia de andrógenos. El vehículo fue de solución salina amortiguada con Tris (TBS). La información para ratones castrados (ORX) o con operación simulada son promedio (n=10 por grupo) $\pm$ SD. ***, $P < 0.001$ vs control TBS. El ActRIIB(25-131)-hFc incrementó el tejido de la masa magra con tanta efectividad como lo hizo su contraparte completa, la ActRIIB(20-134)-mFc.

La **Figura 8** muestra el efecto de ActRIIB(25-131)-hFc en tejido de grasa magra en un ratón modelo de obesidad por dieta inducida. El vehículo fue de solución salina amortiguada con Tris (TBS). La información es promedio (n=9-10 por grupo). ***, $P < 0.001$ vs control TBS. El ActRIIB(25-

131)-hFc incrementó el tejido de la masa magra efectivamente en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

La **Figura 9** muestra el efecto de ActRIIB(25-131)-hFc en tejido adiposo en un ratón modelo de obesidad por dieta inducida. El vehículo fue de solución salina amortiguada con Tris (TBS). La información es promedio (n=9-10 por grupo) $\pm$ SD. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs control TBS. Comparado con el vehículo, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por doce semanas redujo la masa adiposa en aproximadamente la mitad en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

La **Figura 10** muestra concentraciones de suero de triglicéridos en ratones como función de la dieta y tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. La información es promedio $\pm$ SEM. ***, $P < 0.001$. En ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso, la ActRIIB(25-131)-hFc redujo las concentraciones de triglicéridos en más de un 50%, normalizando así los triglicéridos a niveles observados en controles con dietas estándar.

La **Figura 11** muestra concentraciones de suero de ácidos grasos libres (FFA) en ratones como función de la dieta y en tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. La información es promedio $\pm$ SEM. ***, $P < 0.001$. En ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso, la ActRIIB(25-131)-hFc redujo las concentraciones de FFA en casi un 55%, normalizando así los FFA a niveles observados en controles con dietas estándar.

La **Figura 12** muestra concentraciones de lipoproteínas de suero de alta densidad (HDL) en ratones como función de la dieta y tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. La información es promedio $\pm$ SEM. ***, $P < 0.001$. En ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso, la ActRIIB(25-131)-hFc redujo las concentraciones de HDL en casi un 50%, normalizando así los HDL a niveles observados en controles con dietas estándar.

La **Figura 13** muestra concentraciones de lipoproteínas de suero de baja densidad (LDL) en ratones como función de la dieta y tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. La

información es promedio $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$. En ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso, la ActRIIB(25-131)-hFc redujo las concentraciones de LDL en más de un 40%.

La **Figura 14** muestra concentraciones de insulina de suero en ratones como función de la dieta y tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. La información es promedio $\pm$ SEM. **, $P < 0.01$. En ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso, la ActRIIB(25-131)-hFc redujo las concentraciones de insulina en más del 60%, normalizando así la insulina a niveles observados en controles con dietas estándar.

La **Figura 15** muestra concentraciones de adiponectina de suero de en ratones como función de la dieta y tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. Las medidas ELISA detectan todos los isoformas oligoméricos principales (total de adiponectina), y la información es promedio $\pm$ SEM. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. En ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso, la ActRIIB(25-131)-hFc incrementó las concentraciones de adiponectina en más de un 75% y aún elevó la adiponectina significativamente sobre los niveles observados en controles con dietas estándar.

La **Figura 16** muestra cambios termógenos histológicos inducidos dentro del tejido adiposo blanco del epidídimo por tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. Todas las imágenes microscópicas se muestran a la misma magnificación. Coloraciones de hematoxilina y eosina (H&E) indican la habilidad que tiene la ActRIIB(25-131)-hFc de reducir los lípidos a tamaño de gota e introducir grupos de dipocitos pluriloculares (flechas) característicos de grasa marrón. La inmuno-coloración de secciones no adyacentes revelan amplia inducción citoplásmica de UCPI (fluorescencia verde) tanto en los adipocitos pluriloculares como en los uni-loculares.

La **Figura 17** muestra el efecto del tratamiento por 60 días del ActRIIB(25-131)-hFc en niveles de UCPI mRNA en grasa blanca epididimal en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. La información obtenida por reacción en cadena reversa de polimerasa transcriptasa (RT-PCR) en unidades relativas (RU), son promedio $\pm$ SEM; $N = 6-7$ por grupo; *, $p < 0.05$. La

ActRIIB(25-131)-hFc causa un incremento de 60 veces en el mRNA codificando este marcador selectivo de grasa marrón, indicando así la elevada regulación de la capacidad térmica dentro de este depósito de grasa blanca.

La **Figura 18** muestra niveles de mRNA adiponectina en grasa blanca epididimal de ratones como función de la dieta y de tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc por 60 días. La información RT-PCR en unidades relativas (RU) son promedio $\pm$ SEM; n=7 por grupo; *, p<0.05. En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles de mRNA adiponectina en más de un 60%, contribuyendo así a concentraciones elevadas de adiponectina circulante en estos ratones.

La **Figura 19** muestra el efecto de tratamiento por 60 días del ActRIIB(25-131)-hFc en depósitos grasos en el hígado (esteatosis hepática) en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. Las secciones del hígado (todas mostradas a la misma magnificación) coloreadas con Oil Red O revelan deposiciones pronunciadas de lípidos bajo condiciones de dieta alta en grasa pero sin condiciones de control. Las flechas indican varias de muchas gotas de lípido densamente llenas, que están coloreadas con rojo brillante, pero difíciles de discernir en imágenes en blanco y negro. La ActRIIB(25-131)-hFc inhibió la formación de dichas gotas de lípidos y restauró en mayor parte la apariencia del tejido hepático a aquella de los ratones que fueron alimentados con la dieta estándar.

La **Figura 20** muestra el efecto del tratamiento por 35 días del ActRIIB(25-131)-mFc en la distribución de grasa abdominal en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. Los depósitos viscerales y subcutáneos de grasa se detectaron y se diferenciaron in vivo por tomografía micro-computarizada (microCT) que comprendía los segmentos T13-L5 de la columna vertebral. N=4 por grupo; la barra de escala =5 mm. Comparada con los controles con alimentación de dieta alta en grasa, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc redujo el volumen de los depósitos tanto de la grasa abdominal visceral como la de la subcutánea.

La **Figura 21** muestra el efecto del tratamiento por 60 días del ActRIIB(25-131)-mFc en el volumen de grasa visceral como lo determina el microCT en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. La información es promedio $\pm$ SEM; n=4 por grupo;***, P<0.001. En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la ActRIIB(25-131)-mFc redujo el volumen de grasa visceral en más de un 60% comparado con el vehículo.

La **Figura 22** muestra el efecto del tratamiento por 60 días del ActRIIB(25-131)-mFc en el volumen de grasa subcutánea abdominal como lo determina el microCT en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. La información es promedio $\pm$ SEM; n=4 por grupo;***, P<0.001. En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la ActRIIB(25-131)-mFc redujo el volumen de grasa subcutánea en más de un 60% comparado con el vehículo.

La **Figura 23** muestra fotografías de pares bilaterales de depósitos de grasa marrón inter-escapular como función de dieta y de tratamiento por 60 días del ActRIIB(25-131)-mFc en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. La dieta de alto contenido de grasa aumentó el tamaño y aclaró el color de los depósitos mientras que el ActRIIB(25-131)-mFc reversó estos cambios en su mayoría.

La **Figura 24** muestra el efecto del tratamiento por 60 días con ActRIIB(25-131)-mFc en la masa de la grasa marrón inter-escapular en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. La información es promedio $\pm$ SEM para depósitos combinados izquierda y derecha;***, p<0.001. La ActRIIB(25-131)-mFc reversó el efecto de la dieta alta en grasa sobre la masa de este depósito marrón de grasa.

La **Figura 25** muestra el efecto del tratamiento por 60 días con ActRIIB(25-131)-mFc en la densidad de la grasa marrón inter-escapular como lo determina el microCT en un ratón modelo de obesidad inducida por dieta. La información (quiere decir $\pm$ SEM) se expresa en unidades estandarizadas basadas en un valor positivo para el mineral hidroxiapatita (HA) del hueso y un valor de cero para agua; por lo tanto el valor de la grasa es negativa, con valores para la grasa blanca muy cercanos a -120. **, p<0.01. La ActRIIB(25-131)-mFc

completamente reversó el efecto de la dieta alta en grasa sobre la densidad de este depósito marrón de grasa.

La **Figura 26** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFC en masa de tejido magro como lo determina un ratón modelo de envejecimiento por análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) en múltiples puntos de tiempo. La información es promedio de 10-15 ratones por grupo por punto de tiempo; ***, $P < 0.001$ vs vehículo en el mismo punto de tiempo. Luego de dosis por 7 semanas, la masa de tejido magro en ratones envejecidos tratados con ActRIIB(25-131)-mFC aumentó casi un 20% de la línea base en contraste con los valores que esencialmente no cambiaron en los controles tratados con vehículo.

La **Figura 27** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFC en la fortaleza de agarre de la pata delantera determinada en múltiples puntos de tiempo en un ratón modelo de envejecimiento. La información es promedio de 13-15 ratones por grupo en punto de tiempo; **, $P < 0.01$ vs vehículo en el mismo punto de tiempo. Los ratones tratados con ActRIIB(25-131)-mFC mostraron una tendencia global hacia el aumento de la fuerza de agarre a través del estudio, en contraste con la disminución en la fuerza de agarre observada en los controles del vehículo sobre el mismo intervalo.

La **Figura 28** muestra el efecto del tratamiento por 8 semanas con ActRIIB(25-131)-mFC en la densidad mineral del hueso como se determina en un ratón modelo de envejecimiento por absorcionimetría con rayos X de energía dual (DEXA). La información es promedio $\pm$ SEM; *, $P < 0.05$. La densidad mineral del hueso en ratones tratados con ActRIIB(25-131)-mFC ($n=10$) aumentó significativamente comparados con controles tratados con vehículo ($n=14$).

La **Figura 29** muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFC sobre la masa de grasa total del cuerpo determinada en múltiples puntos de tiempo en un ratón modelo de envejecimiento por análisis de NMR. La información es promedio de 10-15 ratones por grupo en punto de tiempo. ***, $P < 0.001$ vs vehículo en el mismo punto de tiempo. Los ratones tratados con ActRIIB(25-131)-mFC mostraron un

porcentaje de reducción de la línea base de más del doble de la magnitud de ellos en los controles tratados con vehículo.

La **Figura 30** muestra el efecto del tratamiento por 8 semanas con ActRIIB(25-131)-mFC en concentraciones de suero de insulina en un ratón modelo de envejecimiento. La información es promedio $\pm$ SEM; *, $P < 0.05$. Las concentraciones de insulina en ratones envejecidos tratados con ActRIIB(25-131)-mFC ($n=10$) se redujeron en más de un 40% comparados con los controles tratados con vehículo ($n=14$).

La **Figura 31** muestra el efecto del tratamiento por 8 semanas con ActRIIB(25-131)-mFC en concentraciones de hemoglobina glicosilada circulante (A1C). La información es promedio $\pm$ SEM; $n=5-6$ por grupo; **, $P < 0.01$. El ActRIIB(25-131)-mFC redujo significativamente las concentraciones de la hemoglobina glicosilada, un indicador extensamente aceptado de concentraciones de glucosa de sangre promedio sobre un período extendido.

La **Figura 32** muestra el efecto del tratamiento por 5 semanas de ActRIIB(25-131)-hFc sobre el tejido de grasa magra como lo determina el análisis de NMR en un modelo de ratón con caquexia de cáncer. La información es promedio $\pm$ SEM; ***, $P < 0.001$. En ratones con implantes de tumores, el tratamiento por vehículo ($n=7$) se asoció con una pérdida del 7% en el tejido de la masa magra, mientras que con el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc ($n=12$) se ocasionó un incremento del 27% en el tejido de masa magra de la línea base.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Visión General

Bajo ciertos aspectos, la presente revelación se relaciona con los poli-péptidos de ActRIIB. Tal como se usa en este, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de receptores de activina de proteína tipo IIBH (ActRIIB) y de proteínas relacionadas con ActRIIB, derivadas de cualquier especie. Los miembros de la familia de ActRIIB generalmente son proteínas de trans-membranas, compuestas por un dominio extracelular de unión-ligando con región rica en cisteína, un dominio de

trans-membranas y un dominio de citoplasma con especificidad predecible de quinasa serina/treonina.

El término "poli-péptido ActRIIB" se utiliza para referirse a poli-péptidos que incluyen cualquier poli-péptido que ocurra naturalmente de un miembro de la familia de ActRIIB así como de variantes de ella (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas péptido-miméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, un poli-péptido ActRIIB incluye poli-péptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia que sea por lo menos idéntica en un 80% a la secuencia de un poli-péptido de ActRIIB y preferiblemente que tenga un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más de identidad.

El precursor humano de ActRIIB tiene la siguiente secuencia de aminoácido, con la señal de péptido subrayada, el dominio extracelular indicado en negrilla y encasillados los sitios potenciales de glicosilación unidos a N (SEQ ID NO:1) (NM_001106, 512 aa).

MTAPWVALALLWGS**SLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHC**
YASWRN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE**
AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG
 PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST
 PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMS

 RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADEGLAVRFEPGKPPGD
 THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP
 FEEEIGQHPSLEELQE VVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG
 CVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Los poli-péptidos ActRIIB pueden incluir cualquier dominio extracelular que ocurra naturalmente de una proteína ActRIIB así como cualquier variante de ellos (incluyendo mutantes, fragmentos y formas péptido-miméticas) que retengan actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína de ActRIIB se une a un ligando y es soluble generalmente. La secuencia de señalización puede ser una nativa de un ActRIIB o una secuencia de señalización de otra proteína como la de una secuencia de señalización de un tejido activador

plasminógeno (TPA) o una secuencia de señalización de melatina de abejas.

En parte, la revelación proporciona un poli-péptido que está truncado de tal manera que la porción derivada del ActRIIB es de los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:1. Como se demuestra aquí, los poli-péptidos de este tipo, cuando se administran como una construcción de Fc, el ActRIIB(25-131)-hFc promueve la formación de masa magra corporal (primordialmente músculo) y la pérdida de masa grasa mientras que también tiene efectos marcadamente convenientes en los parámetros metabólicos tales como los triglicéridos de suero, los ácidos grasos libres de suero y los niveles de suero de insulina. El ActRIIB(25-131)-hFc notablemente tiene un efecto mayor en estos parámetros metabólicos que la proteína relacionada ActRIIB(20-134). Estos datos se presentan en los ejemplos que aparecen más abajo.

Las señales TGF- β se regulan por complejos heteroméricos de receptores de quinasa serina/treonina tipo I y tipo II los cuales a la estimulación con ligandos los fosforilatos y las proteínas SMAD se activan (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores tipo I y II son todas proteínas trans-membranas compuestas de un dominio extracelular de unión ligando con región rica en cisteína, un dominio de trans-membrana y un dominio de citoplasma con especificidad predecible de serina/treonina. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización y los receptores tipo II se requieren para la unión de ligandos y para la expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable luego de la unión de ligandos, resultando en fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

Dos receptores relacionados tipo II ActRIIA y ActRIIB, se han identificado como receptores tipo II para las activinas (Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al, 1992, Cell 68:97-108). Aparte de las activinas, Los ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia 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

y Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54).

Bajo ciertas incorporaciones, el invento presente se relaciona con poner en contra un ligando de receptores de ActRIIB (también conocidos como un ligando de ActRIIB) con un poli-péptido sujeto a ActRIIB (por ej. un poli-péptido ActRIIB-Fc). Así, las composiciones y los métodos del presente invento son útiles para el tratamiento de desórdenes asociados con la actividad anormal de uno o más ligandos de los receptores de ActRIIB. Los ligandos ejemplares de los receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia TGF- β tales como activina, Nodal, GDF3, GDF8, GDF11 y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento de poli-péptidos diméricos y pertenecen a la super-familia TGF-beta. Existen tres activinas que son homo/hetero-dímeros (A, B y AB) de dos sub-unidades β estrechamente relacionadas ($\beta\alpha\beta\alpha$, $\beta\beta\beta\beta$ y $\beta\alpha\beta\beta$). En la super-familia TGF-beta, las activinas son factores únicos y multi-funcionales que pueden estimular la producción de hormonas en los ovarios y en las células de la placenta, soporte a la supervivencia de las células neuronales, influenciar positiva o negativamente el progreso del ciclo-celular dependiendo del tipo de célula e inducir diferenciación mesodérmica por lo menos en 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). Además, el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas se encontró que era idéntico a la activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se sugiere que la activina A actúa como un regulador natural de eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina queda antagonizada por su hetero-dímero la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona que estimula los folículos (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y la síntesis de FSH, mientras que la inhibina previene la secreción y la síntesis. Otras proteínas que pueden regular la bio-actividad de la activina y/o unirse a la activina, incluye la follistatina (FS), la proteína

relacionada con la follistatina (FSRP), α_2 -macroglobulina, Cerberus y endoglina, que se describen más abajo.

La proteína 7 morfo-genética del hueso (BMP7), también llamada Proteína osteogénica-1 (OP-1) se sabe bien que induce la formación de cartílago y de hueso. Adicionalmente, la BMP7 regula una cantidad de procesos fisiológicos. De manera notable, la BMP7 recientemente se ha identificado como promotora clave de diferenciación de adipocitos marrones. (Tseng et al., 2008, Nature 454:1000-1004). En este estudio, la ablación genética de la BMP7 llevó a que hubiera escasez de grasa marrón y casi ausencia total de UCPI en embriones murinos. Además, la expresión de regulación de la BMP/ in ratones por administración del adenovirus incrementó la masa de grasa marrón y el gasto de energía. Así como la activina, la BMP7 se une a los receptores tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, la BMP7 y la activina enganchan receptores distintos del tipo I dentro de receptores complejos heteroméricos. El receptor mayor BMP7 tipo I que se observó fue el ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente con ALK4 (ActRIIB). La BMP7 y la activina produjeron respuestas biológicas distintas y activaron vías diferentes de Smad (Macias-Silva et al., 1998, J.Biol Chem. 273; 25628-36).

El Factor-3 de Crecimiento y Diferenciación (GDF3) también conocido como Vgl-2 relacionado, juega un papel importante en el desarrollo embrionario y también está involucrado en adipogenesis durante la edad adulta. En breve, la expresión 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 sobre-expresión regulada de GDF3 exagera el aumento de adiposidad observada durante condiciones de alto grado de grasa en ratones de tipo silvestre (Wang et al., 2004; Biochem Biophys Res Commun 321:1024-1031). Más importante aún, los ratones con ablación genética de GDF3 son sanos y esencialmente normales cuando se mantienen con una dieta estándar pero están protegidos de ser obesos y muestran una tasa metabólica basal aumentada cuando se mantienen con una dieta alta en grasa (Shen et al., 2009, Mol Endocrinol 23:113-123). Tomados en conjunto, estos hallazgos implican al

GDF3 específicamente en obesidad inducida por la dieta y más generalmente en la regulación de adiposidad.

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y endodermo, así como en la organización subsiguiente de estructuras axiales tales como el corazón y el estómago en la temprana embriogénesis. Se ha demostrado que el tejido dorsal en los embriones vertebrados contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la platina notocorda y pre-cordal mientras que engancha a las células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. La Nodal parece señalizar a través de tanto los receptores tipo I como de los Tipo II y los efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRRIIA y ActRIIB sirven como receptores tipo II para Nodal (Sakuma et al., Genes Cells., 2002, 7:401-12). Se sugiere que los ligandos de Nodal interactúan con sus co-factores (por ej. cripto) para activar los receptores de activina tipo I y tipo II, los cuales fosforilan al Smad2. Las proteínas Nodal están involucradas en muchos eventos críticos del embrión vertebrado temprano, incluyendo la formación del mesodermo, el patrón anterior y la especificación del eje izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización Nodal activa el pAR3-Lux, un reportador de la luciferasa que previamente había demostrado que respondía específicamente con la activina y con el TGF-beta. Sin embargo, la Nodal no puede inducir el pTlx2-Lux, un reportador que responde específicamente a las proteínas morfo-genéticas del hueso. Los resultados recientes suministran evidencia bioquímica directa que la señalización Nodal se regula mediante tanto por la vía activina-TGF-beta de Smads, como por el Smad2 y el Smad3. Más evidencia ha demostrado que la proteína cripto extracelular se requiere para la señalización Nodal, haciéndola distinta de la activina o de la señalización TGF-beta.

El Factor-8 de Crecimiento y Diferenciación (GDF8) se conoce también como miostatina. El GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. El GDF8 se expresa prominentemente en el músculo esquelético en desarrollo y en el adulto. La mutación nula del GDF8 en ratones transgénicos

se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McFerron et al., *Nature*, 1997, 387:83-90). Son evidentes los aumentos similares en la masa muscular esquelética en mutaciones de GDF8 que ocurren naturalmente 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 Kamadur et al., *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en humanos (Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004; 350:2682-8). Los estudios también han demostrado que el desgaste muscular asociado con la infección del VIH en humanos se acompaña de aumento de la expresión de la proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS*, 1998, 95:14938-43). Adicionalmente, el GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ej. la creatina quinasa "cinasa") y modula la proliferación de las células del mioblasto (WO 00/43781). El pro-péptido del GDF8 puede unirse no covalentemente al dímero del dominio del GDF8 maduro, inactivando 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 al GDF8 o proteínas relacionadas estructuralmente y que inhiben su actividad biológica, incluyen la follistatina y potencialmente las proteínas relacionadas con la follistatina (Gamer et al., (1999) *Dev. Biol.*, 208:222-232).

El Factor-11 de Crecimiento y Diferenciación (GDF11) conocido también como BMP11, es una proteína que se secreta (McPherron et al., 1999, *Nat. Genet.* 22:260-264). El GDF11 se expresa en el brote caudal, en el brote de la extremidad, en los arcos maxilares y mandibulares y en los ganglios dorsales de la raíz durante el desarrollo del ratón (Nakashima et al., 1999, *Mech. Dev.* 80:185-189). La GDF11 juega un rol único en los patrones tanto de los tejidos mesodérmicos como de los neurales (Gamer et al., 1999, *Dev. Biol.*, 208:222-32). La GDF11 demostró ser un regulador negativo de condrogenesis y miogenesis en el desarrollo de las extremidades de pollitos (Gamer et al., 2001, *Dev. Biol.* 229:407-420). La expresión de la GDF11 en el músculo sugiere también su rol en la regulación del crecimiento del músculo de manera similar a la GDF8. Adicionalmente, la expresión de la GDF11 en el cerebro

sugiere que la GDF11 puede también poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. De manera interesante, se encontró que la GDF11 inhibe la neurogenesis en el epitelio olfativo (Wu et al., 2003, Neuron. 37: 197-207). Por ende, la GDF11 puede tener aplicaciones in vitro e in vivo en el tratamiento de enfermedades tales como del enfermedades del músculo así como neurodegenerativas (por ej. esclerosis lateral amiotrófica).

Bajo ciertos aspectos, el presente invento se relaciona con el uso de ciertos poli-péptidos de ActRIIB para ofrecer antagonismo en general a la señalización de los ligandos de ActRIIB en cualquier proceso asociado con la actividad de los ActRIIB. Opcionalmente, los poli-péptidos de ActRIIB del invento pueden antagonizar a uno o más ligandos de los receptores de ActRIIB tales como la activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7 y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de desórdenes adicionales.

Por lo tanto, el presente invento contempla el uso de los poli-péptidos en el tratamiento o prevención de enfermedades o condiciones que están asociadas con la actividad anormal de un ActRIIB o de un ligando de ActRIIB. El ActRIIB o los ligandos de ActRIIB están involucrados en la regulación de muchos procesos biológicos importantes. Debido a sus funciones claves en estos procesos, pueden ser blancos apetecibles para intervención terapéutica. Por ejemplo, los poli-péptidos de ActRIIB (por ej. los poli-péptidos ActRIIB-Fc) pueden utilizarse para tratar desórdenes y condiciones en humanos o animales. Un ejemplo de tales desórdenes o condiciones incluyen, pero no se limitan a, desórdenes metabólicos tales como la diabetes tipo 2, baja tolerancia a la glucosa, síndrome metabólico (por ej. el síndrome X) y la resistencia a la insulina inducida por trauma (por ej., quemaduras o desequilibrio en nitrógeno); desórdenes del tejido adiposo (por ej. la obesidad); desórdenes de los músculos o neuromusculares tales como la distrofia muscular (incluyendo la distrofia muscular de Duchenne); la esclerosis lateral amiotrófica (ELA); la atrofia muscular, atrofia de los órganos; debilidad; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de debilidad muscular. Otros

ejemplos incluyen osteoporosis particularmente en las mujeres mayores y/o post-menopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; y fracturas relacionadas con osteoporosis. Pero otros ejemplos también incluyen masa ósea escasa debido a terapia crónica con glucocorticoides, falla gonadal prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo, deficiencias nutricionales y anorexia nervosa. Estos desórdenes y condiciones se tratan más abajo bajo "Usos Terapéuticos Ejemplares"- Como se puede anotar, los polipéptidos de ActRIIB truncados que aparecen en el presente parecen tener efectos especialmente benéficos en parámetros metabólicos.

Los términos utilizados en esta especificación, generalmente tienen sus significados ordinarios en el arte, dentro del contexto de este invento y en el contexto específico donde cada término se utiliza, Ciertos términos se tratan más abajo o en otro sitio de la especificación con el fin de proporcionar guías adicionales para el practicante al describir las composiciones y métodos del invento y cómo hacerlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será aparente desde el contexto específico en el cual se utiliza el término.

"Alrededor de" o "aproximadamente" generalmente significa un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Comúnmente, los grados de error como ejemplo están dentro del 20% (%), preferiblemente dentro de un 10% y más preferiblemente dentro de un 5% de un valor o rango de valor dado.

Alternativamente, y en particular en los sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de un 5° o más preferiblemente de un 2° de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en el presente son aproximadas salvo que se indique otra cosa, significando que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indica expresamente.

Los métodos del invento pueden incluir pasos para comparar secuencias entre sí, incluyendo secuencias de tipo silvestre para uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones generalmente incluyen alineaciones de secuencias de polímeros, por ej., utilizando programas de alineación y/o algoritmos bien conocidos dentro del arte (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, para nombrar solo unos pocos). El artesano hábil puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o supresión de residuos, la alineación de secuencia introducirá un "espacio" (representado generalmente por un guión o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o suprimido.

"Homólogo" en todas sus formas gramaticales y variaciones de delecteo, se refiere a la relación entre dos proteínas que tienen un "origen de evolución común", incluyendo las proteínas de super-familias en la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificados) tienen una homología secuencial, como se refleja en la similitud de su secuencia, ya sea en términos de identidad porcentual o por la presencia de residuos específicos o motivos y posiciones conservadas.

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

Sin embargo, en el uso común y en las aplicaciones instantáneas, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a similitud en secuencia y puede relacionarse o no con un origen evolutivo común.

2. Poli-péptidos ActRIIB

Bajo ciertos aspectos, el invento se relaciona con poli-péptidos ActRIIB (por ejemplo los poli-péptidos ActRIIB-Fc), y formas particularmente truncadas ejemplificadas por poli-péptidos que incluyen amino ácidos 25-131 de SEQ ID NO:1 y

variantes de éstos. Opcionalmente, los fragmentos, las variantes funcionales, y las formas modificadas tienen actividades biológicas similares o las mismas de sus correspondientes poli-péptidos de ActRIIB de tipo silvestre. Por ejemplo, una variante de ActRIIB del invento puede unirse a un ligando de ActRIIB (por ej. activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7), e inhibir la función de ésta. De manera opcional, un poli-péptido ActRIIB regula el crecimiento de tejidos tales como óseo, cartílago, músculo o grasa o parámetros metabólicos tales como los triglicéridos, los ácidos grasos libres o la insulina. Los ejemplos de poli-péptidos ActRIIB incluyen precursor humano de poli-péptido ActRIIB (SEQ ID NO:1), y proteínas de fusión Fc, por ejemplo SEQ ID Nos 3 y 8. Las variaciones en estos poli-péptidos pueden prepararse de acuerdo con la siguiente guía. La numeración de aminoácidos en los poli-péptidos ActRIIB se basa en la secuencia SEQ ID NO:1, sin importar si se utiliza la secuencia líder nativa.

La revelación identifica porciones y variantes activas funcionalmente de ActRIIB, Los Solicitantes han confirmado que una proteína de fusión Fc con su secuencia revelada por Hilden et al. (Blood, 1994 Apr 15;83(8):2163-70) que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de SEQ ID NO:1 (A64), tiene una afinidad relativamente baja para activina y para GDF11. Por contraste, la misma proteína de fusión Fc con una Arginina en la posición 64 (R64) tiene afinidad por la activina y el GDF11 en el rango de bajo nanomolar al alto pico-molar. Por lo tanto, una secuencia con un R64 se utiliza como secuencia de referencia para el ActRIIB humano en esta revelación.

Attisano et al. (Cell 1992 Jan 10;68(1):97-108) mostraba que la supresión del punto de prolina en el terminal-C del dominio de ActRIIB reducía la afinidad del receptor para la activina. Las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión de ligandos.

El bolsillo de unión de ligandos ActRIIB se define con los residuos Y31, N33, N35, L38, hasta el T41, E47, E50, Q53 hasta el K51, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 hasta el N83, Y85, R87, A92 y E94 hasta F101. En estas posiciones, se espera que

las mutaciones conservadoras serán toleradas aunque una mutación K74A es bien tolerada como también lo son la R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. La R40 es una K en *Xenopus*, indicando que los aminoácidos básicos en esta posición se tolerarán. El Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB *Xenopus*20 y por lo tanto los aminoácidos incluyendo R, K, Q, N y H se tolerarán en esta posición. Así, una proteína ActRIIB puede ser una que incluya aminoácidos 25-131 e incluyan no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores en los aminoácidos en el bolsillo de unión de ligandos, y cero, uno o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión de ligandos. Tal proteína puede retener más del 80%, 90%, 95% o 99% de la identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:1. Los sitios fuera del bolsillo de unión en los cuales la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen la terminación del amino y del carboxilo del dominio extracelular (como se indicó más arriba), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a la alanina en la posición 65 (N65A) mejora la unión de ligandos en el fundamento del A64 y se espera que así no haya efectos nocivos en la unión de ligandos del fundamento del R64. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en el N65 en el fundamento de A64, demostrando así que un cambio significativo en esta región posiblemente será tolerada. Mientras que un cambio en R64 no se tolera bien, el R64K se tolera bien y así otro residuo básico, tal como el H puede ser tolerado en la posición 64.

El ActRIIB se conserva bien en casi todos los vertebrados, con largos trechos del dominio extracelular conservados por completo. Muchos de los ligandos que se unen al ActRIIB también están bien conservados. De la misma manera, la comparación entre las secuencias de ActRIIB de varios organismos vertebrados suministra claridad sobre los residuos que pueden alterarse. Por lo tanto un ActRIIB humano activo puede incluir uno o más aminoácidos en posiciones correspondientes de la secuencia de otro vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIB. El L46 es una valina en el ActRIIB *Xenopus*, indicando que este sitio puede ser alterado y opcionalmente puede ser alterado para otro residuo

hidrofóbico, tal como V, I o F, o un residuo no polar como un A. El E52 es una K en *Xenopus*, indicando que este sitio puede ser tolerante de una gran variedad de cambios, incluyendo residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. El T93 es una K en *Xenopus* indicando que una amplia variación estructural se tolera en esta posición, con residuos polares preferidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G y Y. El F108 es Y en *Xenopus* y por lo tanto y u otro grupo hidrofóbico, tal como I, V o L serían tolerados. El E111 es K en *Xenopus* indicando que los residuos cargados se tolerarán en esta posición, incluyendo D, R, K y H así como Q y N. El R112 es K en *Xenopus* indicando que los residuos básicos se toleran en esta posición, incluyendo R y H. A en una posición 119 está relativamente mal conservada y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, por lo tanto esencialmente cualquier aminoácido debería ser tolerado en esta posición.

Otros sitios de glicosilación unidos a N (N-X-S/T) pueden agregarse a un poli-péptido ActRIIB y pueden aumentar la media-vida del suero de una proteína de fusión ActRIIB relativa a la forma ActRIIB(R64)-Fc. Se pueden encontrar ejemplos de secuencias de NX(T/S) en (NQS)42-44 y (NSS)65-67, aunque estas últimas no estaría eficientemente glicosilada con el R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T generalmente pueden ser introducidas a posiciones fuera del bolsillo de la unión de ligandos. Sitios particularmente aptos para la introducción de secuencias de aminoácidos N-X-S/T no endógenas, incluyen 20-29, 20-24, 22-25, 109-134. 120-134 o 129-134. Las secuencias N-X-S/T también pueden ser introducidas al ligador entre la secuencia de ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Tal sitio puede introducirse como esfuerzo mínimo introduciendo una N en la posición correcta con relación a una N pre-existente. Así las alteraciones que se desean que crearían un sitio de glucosilación unida a N son: A24N, R64N, S67N (combinados posiblemente con una alteración de N65A), E106N, R112N, G120N, E123m, P129N, A132N, R112S y RII2T. Cualquier S que se pronostique que sea glicosilada puede ser alterada a una T sin crear un sitio inmunológico debido a la protección que le da la glicosilación. De la misma forma, cualquier T que se pronostique que sea glicosilada puede ser alterada a una S. Así, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. De la misma

manera, en una variante A24N se puede utilizar una alteración S26T. En consecuencia, una variante ActRIIB puede incluir una o más secuencias de consenso glicosiladas no endógenas unidas a N.

Las variaciones descritas pueden combinarse de varias formas. Adicionalmente, existen posiciones de aminoácidos en ActRIIB que son generalmente ventajosas para conservarlas. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrofóbico), la posición 78 (hidrofóbica y especialmente triptófano), la posición 37 (ácido y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrofóbico en particular fenilalanina o tirosina). Otras posiciones que se desean conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, en especial E, D, R o K).

En ciertas incorporaciones, este invento contempla hacer variantes funcionales al modificar la estructura de un polipéptido ActRIIB para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ej. vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Los poli-péptidos modificados de ActRIIB pueden ser fabricados por ejemplo por sustitución, supresión o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un Glutamato, una treonina con una serina o reemplazos similares de aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente (por ej. mutaciones conservadoras) no tendrá mayor efecto en la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que ocurren dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Ya sea que un cambio en la secuencia de un aminoácido de un poli-péptido ActRIIB resulte en un homólogo funcional pueda determinarse fácilmente al evaluar la habilidad del poli-péptido variante de ActRIIB para producir una respuesta en las células de una manera similar al polipéptido ActRIIB de tipo silvestre, o unirse a uno o más

ligandos, tales como la activina, el GDF-11 o la miostatina de manera similar al tipo silvestre.

En algunas incorporaciones específicas, el presente invento contempla hacer mutaciones en el dominio extracelular (también conocidos como dominio unido al ligando) de un polipéptido ActRIIB tal que el polipéptido ActRIIB variante (o mutante) ha alterado las actividades de la unión-ligando (por ej. afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, tales como los polipéptidos ActRIIB variantes han alterado (o elevado o reducido) la afinidad de unión para un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos variantes ActRIIB han alterado la especificidad de unión de sus ligandos.

En algunas incorporaciones, el presente invento contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIB de manera que altere la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación relacionados con O ó con N. Los sitios de reconocimiento deglicosilación relacionados con asparagina generalmente incluyen una secuencia tri-péptida, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que está específicamente reconocido por las enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración puede también hacerse por la adición de uno o más residuos de serina o treonina, o por la sustitución de los mismos, a la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo silvestre (para sitios de glicosilación relacionados con O). Una variedad de sustituciones o supresiones de aminoácidos en una o en ambas de las primeras o terceras posiciones de aminoácido de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o supresión de aminoácido a la segunda posición) resulta en que no haya glicosilación en la secuencia tri-péptida modificada. Otros medios para incrementar el número de unidades de carbohidratos en un polipéptido ActRIIB es por acoplamiento de glicósidos químicos o enzimáticos al polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento que se utilice, los azúcares pueden ser unidos a (a) una arginina e histidina; b) grupos libres de carboxilos; c) grupos libres de sulfhídricos tales como aquellos de la cisteína; d) grupos libres de hidroxilo tales como aquellos

de serina, treonina o hidroxiprolina; e) residuos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano; o f) el grupo de amidas de Glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin Y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp.259-306, incorporado por referencia en el presente. La remoción de una o dos mitades de carbohidratos presentes en un poli-péptido ActRIIB puede ser hecha química y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede involucrar, por ejemplo, la exposición del poli-péptido ActRIIB al compuesto de ácido trifluoro-metanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en segmentación de la mayoría de todos los azúcares salvo el azúcar de ligamiento (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que la secuencia de aminoácido permanece intacta. La des-glicolización la describe también Hakimuddin et al., (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem., 118:131. La segmentación enzimática de las mitades de carbohidratos en los poli-péptidos ActRIIB puede lograrse por el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas como las describe Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un poli-péptido ActRIIB puede ajustarse, como sea adecuado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, como el mamífero, almidón, las células de insectos y plantas, pueden todas introducir patrones que difieren de glicosilación que pueden ser afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas de ActRIIB para uso en humanos se expresan en una línea de célula mamífera que suministra adecuada glicosilación, tal como unas líneas de célula HEK293 o CHO aunque otras líneas de células de expresión mamífera se espera que sean útiles también.

Esta revelación contempla también un método para generar variantes, en particular juegos de variantes combinadas de un poli-péptido ActRIIB incluyendo, opcionalmente, variantes truncadas; los pools de mutantes combinatorios son particularmente útiles para identificar las secuencias variantes funcionales. El propósito de seleccionar tales combinaciones de bibliotecas puede ser el generar, por ejemplo, variantes de poli-péptidos ActRIIB que tienen propiedades alteradas, tales como fármaco-cinéticos alterados

o uniones de ligandos alterados. Una variedad de ensayos de selección aparecen más abajo y dichos ensayos pueden ser utilizados para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante de poli-péptido de ActRIIB puede ser seleccionada para la habilidad para unirse a un poli-péptido ActRIIB, para prevenir la unión de un ligando de ActRIIB con un poli-péptido de ActRIIB.

La actividad de un poli-péptido ActRIIB puede ser ensayado también con base en una célula o en ensayo in vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto del variante de un poli-péptido ActRIIB en la expresión de genes involucrados en la producción de hueso en un osteoblasto o precursor. Si es necesario, se puede lograr en presencia de una o más proteínas ligando de un recombinante ActRIIB (por ej., BMP7), y las células pueden transfeccionarse para producir un poli-péptido ActRIIB y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRIIB. De la misma forma, un poli-péptido ActRIIB puede administrarse a un ratón o a otro animal, y se pueden evaluar una o más propiedades del hueso, tales como volumen o densidad. La tasa de recuperación para las fracturas de hueso también se puede evaluar. De manera similar, la actividad de un poli-péptido ActRIIB o sus variantes pueden ser examinadas en las células musculares, adipocitos y células de neurona por cualquier efecto en el crecimiento de estas células, por ejemplo, por medio de los ensayos que se describen más abajo. Dichos ensayos son bien conocidos y de rutina en el arte. Un gene reportero que responde al SMAD puede utilizarse en dichas líneas celulares para monitorear los efectos en la señalización hacia abajo.

Se pueden generar las variantes derivadas de combinaciones que tienen una potencia selectiva relativa a un poli-péptido ActRIIB. Dichas proteínas variantes cuando se expresan de construcciones recombinantes de ADN, pueden utilizarse en protocolos de terapia de genes. De manera similar, la mutagenesis puede hacer que surjan variantes que tienen medias vidas diferentes dramáticamente a aquellas que corresponden a un poli-péptido ActRIIB tipo silvestre. Por ejemplo, la proteína alterada puede ser rendida más o menos establemente a la degradación proteólita u otros procesos que resultan en destrucción, o inactivación, de un poli-péptido

ActRIIB. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden ser utilizados para alterar los niveles de polipéptidos de ActRIIB al modular la vida media de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una media vida corta puede conllevar a efectos biológicos más transitorios y, cuando son parte de un sistema de expresión inducible, pueden permitir un control más firme de los niveles de poli-péptido recombinante ActRIIB dentro de la célula.

En ciertas incorporaciones, los poli-péptidos de ActRIIB pueden incluir modificaciones post-translacionales adicionalmente a cualquiera que estén naturalmente presentes en los poli-péptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acililación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de ActRIIB modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como glicoles de polietileno, lípidos, poli- o mono-sacáridos y fosfatos. Los efectos en tales elementos no aminoácidos en la funcionalidad de los poli-péptidos de ActRIIB pueden ser probados como se describe en el presente para otras variantes de poli-péptidos de ActRIIB. Cuando un poli-péptido de ActRIIB se produce en células por segmentación de una forma naciente del poli-péptido ActRIIB, el procesamiento post-translacional puede ser importante también para el plegamiento correcto y/o función de la proteína. Las células diferentes (tales como la CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-373 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades translacionales y pueden ser elegidas para asegurarse de la modificación y el procesamiento correcto de los poli-péptidos ActRIIB.

Bajo ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los poli-péptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen por lo menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión.

Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, poli-histidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ej. un Fc), una proteína de unión de

maltosa (MPB) o albúmina de suero humano. Un dominio de fusión puede seleccionarse para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para propósitos de purificación de la afinidad, las matrices relevantes para cromatografía de afinidad, se utilizan como resinas conjugadas de glutatión- amilasa- y níquel o cobalto. Muchas de estas matrices están disponibles en "kits" tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con socios de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, un dominio de fusión puede ser elegido para facilitar la detección de los poli-péptidos ActRIIB. Los ejemplos para tales dominios de detección incluyen varias proteínas fluorescentes (p.e., GFP) así como "marcador de epítopes" que son generalmente secuencias pequeñas de péptidos para los cuales está disponible un anticuerpo específico. Los marcadores de epítopes bien conocidos para los cuales existen anticuerpos monoclonales específicos fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina de virus de influenza (HA) y marcadores c-mic. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de segmentación de proteasa tal como para el Factor Xa o Trombina que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y por lo tanto liberan las proteínas recombinantes de éste. Las proteínas liberadas entonces pueden ser aisladas del dominio de fusión por subsiguiente separación por cromatografía. En algunas incorporaciones preferenciales, un poli-péptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el poli-péptido de ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizador"). Estabilizador quiere decir cualquier cosa que incremente la vida media del suero, sin importar si esto es por disminución en destrucción, disminución por depuración por el riñón u otro efecto fármaco-cinético. Las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina se sabe que confieren propiedades deseables fármaco-cinéticas en una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a la albúmina del suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios de multimerización (por ej. dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica

adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento del músculo).

Como ejemplo específico, el presente invento provee una proteína fusión como un antagonista de GDF8 que incluye un dominio extracelular (p.ej. unión-GDF8), fusionado con un dominio Fc (p.e. SEQ IN NO:9).

THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*

De manera opcional, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En algunos casos, el dominio Fc mutante teniendo una o más de estas mutaciones (p.ej. la mutación Asp-265) ha reducido la habilidad de unirse al receptor relativo Fc γ a un dominio Fc tipo silvestre. En otros casos, el dominio mutante Fc teniendo una o más de estas mutaciones (p.ej. la mutación Asn-434) ha incrementado la habilidad de unir el receptor Fc relacionado con la clase I MHC relativa a un dominio tipo silvestre de Fc.

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden organizarse de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un poli-péptido ActRIIB puede ser ubicado en terminal-C a un dominio heterólogo o, alternativamente, un dominio heterólogo puede ubicarse en terminal-C a un poli-péptido ActRIIB. El dominio del poli-péptido ActRIIB y el dominio heterólogo no tienen que necesariamente estar adyacentes en una proteína de fusión y los dominios adicionales o secuencias de aminoácidos pueden incluirse en terminal C- o N- para cualquiera de los dominios o entre ellos.

En ciertas incorporaciones, los poli-péptidos ActRIIB de este invento contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los poli-péptidos del ActRIIB. Por ejemplo, tales modificaciones realzan la media vida in vitro de los poli-péptidos ActRIIB, realzan la media vida circulatoria de los poli-péptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica

de los poli-péptidos ActRIIB. Dichas modificaciones de estabilización incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de fusión (incluyendo por ejemplo las proteínas de fusión que tienen un poli-péptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio glicosilado (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio glicosilado a un poli-péptido ActRIIB), y modificaciones de mitades de carbohidrato (incluyendo por ejemplo la remoción de las mitades de carbohidratos de un poli-péptido ActRIIB). En el caso de las proteínas de fusión, un poli-péptido ActRIIB se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula IgG (p.ej. un dominio Fc). Como se utiliza aquí, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (p. ej., Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas tales como mitades de carbohidratos o un polímero no proteináceo, tal como un glicol de polietileno.

En ciertas incorporaciones, este invento hace disponible formas aisladas y/o purificadas de los poli-péptidos ActRIIB que se aíslan, o que están sustancialmente libres de otras proteínas.

En ciertas incorporaciones, los poli-péptidos ActRIIB del invento (sin modificación o modificados) pueden ser producidos por una variedad de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, tales poli-péptidos ActRIIB pueden sintetizarse utilizando técnicas estándar de química de proteína tales como las descritas 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). Adicionalmente, los sintetizadores de péptidos automatizados están disponibles comercialmente (p. ej. *Advances ChemTech Model 396*; *Milligen/Biosearch 9600*). Como es bien conocido en el arte (ver más abajo también), alternativamente, los poli-péptidos, fragmentos o variantes de ellos pueden ser producidos recombinantemente, utilizando varios sistemas de expresión (p. ej. *E. coli*, células Ováricas de Hámster Chinas, células COS, báculo-virus). En otra incorporación, los poli-péptidos ActRIIB modificados o sin modificar pueden ser producidos por la digestión de poli-péptidos ActRIIB producidos totalmente por

ocurrencia natural o recombinante al utilizar, por ejemplo, una proteasa, por ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o un aminoácido básico emparejado con una enzima de conversión (PACE). Se puede utilizar un análisis de computador (utilizando un software comercialmente disponible, por ej. MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.), para identificar los sitios de segmentación proteolíticos. Alternativamente, tales poli-péptidos pueden ser producidos de poli-péptidos producidos totalmente por ocurrencia natural o recombinante tales como con técnicas estándar conocidas en el arte, como por segmentación química (p.ej. bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos Nucleicos codificando los poli-péptidos ActRIIB

Bajo ciertos aspectos, el invento suministra ácidos nucleicos aislados y/o recombinados que codifican cualquiera de los poli-péptidos ActRIIB que se revelan en este. Por ejemplo, SEQ ID NO:4 codifica un poli-péptido precursor ActRIIB(25-131)-hFc, mientras que SEQ ID NO:6 codifica la misma proteína pero con una secuencia alternativa y los nucleótidos 73-396 de cada una de las SEQ ID NO 4 y 6 codifican una porción derivada de ActRIIB de las proteínas codificadas. Los ácidos nucleicos sujetos pueden ser de una sola o de doble hebra. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o de ARN. Estos ácidos nucleicos pueden ser utilizados, por ejemplo, en métodos para hacer poli-péptidos ActRIIB.

Por ejemplo, la siguiente secuencia codifica un precursor poli-péptido ActRIIB humano que ocurre naturalmente (SEQ ID NO:2) (nucleótidos 5-1543 de NM_001106, 1539 bp):

atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtct
 gggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctg
 gagcgcaccaaccagagcggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctg
 cactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggc
 tgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggag
 aacccccagggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttact
 catttgccagaggctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagcccc
 accctgctcacggtgctggcctactcactgctgcccatcgggggcctttccctcacc
 gtccctgctggccttttggtgtaccggcatcgcaagccccctacgggtcatgtggac
 atccatgaggaccctgggcctccaccaccatcccctctggtgggcctgaagccactg
 cagctgctggagatcaaggctcgggggcgcttttggtgtgtctggaaggcccagctc
 atgaatgactttgtagctgtcaagatcttcccactccaggacaagcagtcgtggcag
 agtgaacgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttc
 attgctgccgagaagcgaggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggcc
 ttccatgacaagggtccctcacggattacctcaaggggaacatcatcacatggaac
 gaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctcatacctgcatgaggat
 gtgccctggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgccacagggactttaaa
 agtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttg
 gctgttcgatttgagccagggaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacg
 agacggtacatggctcctgaggtgctcgaggagccatcaacttccagagagatgcc
 ttccctgcgcattgacatgtatgccatgggggttggtgctgtgggagcttgtgtctcgc
 tgcaaggctgcagacggaccctgggatgagtacatgctgccctttgaggaagagatt
 ggccagcacccttcggttgaggagctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgagg
 cccaccattaaagatcactgggttgaaacacccgggcctggcccagctttgtgtgacc
 atcgaggagtgtgtggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtgtggag
 gagcgggtgtccctgattcggagggtcgggtcaacggcactacctcggaactgtctcgtt
 tccttggtgacctctgtcaccaatgtggacctgccccctaaagagtcaagcatctaa

La siguiente secuencia codifica un poli-péptido ActRIIB
 humano soluble extracelular (SEQ ID NO: 10) (348 bp)

tctgggctgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggag
 ctggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcgg
 ctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaag
 ggctgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgag
 gagaacccccagggtgtactttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttc
 actcatttgccagaggctggggggcccgggaagtcacgtacgagccacccccgacagcc
 cccacc

Bajo ciertos aspectos, los ácidos nucleicos sujetos que codifican los poli-péptidos ActRIIB se entiende que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 4 o 6. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos, tales como variantes alélicas, y deberán por lo tanto incluir secuencias de codificación que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación designada en SEQ ID NO:4 o 6.

En ciertas incorporaciones, el invento proporciona secuencias aisladas o recombinadas de ácido nucleicos que son por lo menos idénticas a SEQ ID NO: 4 o 6 en un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%, y particularmente aquellas porciones de esta que se derivan de ActRIIB (nucleótidos 73-396). Alguien ordinariamente experto en el arte, apreciará que las secuencias del ácido nucleico complementario a SEQ ID NO:4 o 6, y variantes de SEQ ID NO:4 están también dentro del alcance de este invento. En incorporaciones subsiguientes, las secuencias de ácido nucleico del invento pueden ser aisladas, recombinadas y/o fusionadas con una secuencia nucleótida heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

En otras incorporaciones, los ácidos nucleicos del invento también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan bajo condiciones muy astringentes a la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 4 o 6, o fragmentos de este (p.ej. nucleótidos 73-396). Como se trató más arriba, alguien ordinariamente experto en el arte comprenderá muy fácilmente que las condiciones de astringencia que promueven la hibridación del ADN pueden ser variadas. Por ejemplo, uno puede lograr la hibridación a 6.0 x citrato de cloro/sodio

(SSC) a aproximadamente 45°C, seguida de un lavado de 2.0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso del lavado puede seleccionarse de una baja astringencia de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C a una alta astringencia de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Adicionalmente, la temperatura en el paso de lavado puede aumentarse de condiciones de astringencia baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C a condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65°C., tanto la temperatura como la concentración de sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal pueden ser constante mientras que se cambia la otra variable. En una incorporación, el invento suministra ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de astringencia baja de 6 x SSC a temperatura ambiente seguida de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los nucleicos que aparecen en SEQ ID NO: 4 o 6 debido a degeneración en el código genético también están dentro del alcance del invento. Por ejemplo, por más de un triplete se designa un número de aminoácidos. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o los sinónimos (por ejemplo, el CAU y el CAC son sinónimos de la histidina) pueden resultar en mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de los aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que la secuencia de polimorfismos del ADN que sí conlleva a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas existirá entre las células mamíferas. Alguien experto en el arte apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta un 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína en particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a variaciones alélicas naturales. Cualquiera y todas dichas variaciones en nucleótidos los polimorfismos de los aminoácidos resultantes están dentro del alcance de este invento.

En ciertas incorporaciones, los ácidos nucleicos recombinantes del invento pueden ser vinculados factiblemente a una o más secuencias de nucleótidos reguladores en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladores generalmente son adecuadas para la célula huésped usada para la expresión. En el arte se conocen numerosos

tipos de vectores de expresión adecuados y secuencias reguladoras apropiadas para una variedad de células huésped. Generalmente, dichas una o más secuencias nucleótidas reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líderes o de señalización, sitios de unión ribosomales, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación traduccional y secuencias de realce o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en el arte quedan contemplados en el invento. Los promotores pueden ser promotores que ocurren naturalmente o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructor de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el constructor de expresión puede estar insertado en un cromosoma. En una incorporación preferencial, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección para permitir la selección de células transformadas del huésped. Los genes de marcador de selección son bien conocidos en el arte y variarán con la célula huésped utilizada.

En ciertos aspectos del invento, el sujeto del ácido nucleico se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica un poli-péptido ActRIIB y está vinculado factiblemente a por lo menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en el arte y están seleccionadas para dirigir la expresión del poli-péptido ActRIIB. En consecuencia, el término secuencia regulatoria incluye promotores, acrecentamientos y otros elementos de control de expresión. Las secuencias reguladoras ejemplares las describe Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Anzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de controles de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está vinculado factiblemente a esta puede ser utilizada en estos vectores para expresar secuencias de ADN codificando un poli-péptido de ActRIIB. Tales secuencias de control de expresión útiles, incluyen, por ejemplo los tempranos y tardíos promotores de SV40, promotores tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuyas expresiones

son dirigidas por la polimerasa T7 RNA, el mayor operador y promotor de regiones de fago lambda, las regiones de control para la proteína de capa fd, el promotor para la quinasa fosfoglicerasa-3 u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de α -apareamiento del almidón, el promotor poliedro del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y varias combinaciones de éstas. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a ser transformada y/o el tipo de proteína que se desee expresar. Además, el número de copia del vector, la habilidad para controlar ese número de copia y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como los marcadores antibióticos, deben también considerarse.

Un ácido nucleico recombinado del invento puede producirse al ligar el gen clonado, o una porción de este, a un vector adecuado para la expresión en células ya sean procariotas, eucariotas (almidón, aviario, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para expresiones en células procariotas, tales como el *E. coli*.

Algunas expresiones de vectores mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como uno o más unidades de transcripción eucariota que se expresan en las células eucariotas. Los vectores derivados pc-DNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión mamífera aptos para transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322 para facilitar la replicación y la selección de resistencia a las drogas tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus tales como el virus de papiloma bovino (BPV-1), o el

virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y el p205) pueden ser utilizados para expresiones transitorias de proteínas en células eucariotas. Se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión viral (incluyendo retrovirales) más abajo en la descripción de terapia de genes en los sistemas de entregas. Los varios métodos empleados en la preparación de plásmidos y en la transformación de organismos de huéspedes son bien conocidos en el arte. Para otros sistemas adecuados de expresión tanto para las células procariotas como las eucariotas, así como procedimientos generales para recombinar, ver *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. Por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), Capítulos 16 y 17. Algunas veces puede ser mejor expresar los poli-péptidos recombinantes usando un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como el pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tal como el pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (como el β -gal que contiene el pBlueBacIII).

En una incorporación preferida, un vector puede ser designado para la producción del objeto de los poli-péptidos ActRIIB en células de CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pCDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como se puede ver, las construcciones del gene sujeto pueden usarse para causar expresiones del objeto de poli-péptidos ActRIIB en células propagadas en cultivo, p.ej. para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

El invento también concierne a una célula huésped de transfección con un gen recombinante incluyendo una secuencia de codificación (p.ej., SEQ ID MO:4 o 6) para uno o más del objeto poli-péptido ActRIIB. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un poli-péptido ActRIIB del invento puede expresarse en células bacterianas tales como el *E. coli*, células de insectos (por ej. utilizando un sistema de expresión bacilovirus), células de almidón o mamíferas. Aquellos expertos en el arte conocen otras células huésped adecuadas.

En consecuencia, el presente invento también se relaciona con métodos para producir el objeto de los poli-péptidos ActRIIB. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión codificando un poli-péptido ActRIIB puede ser cultivado bajo condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del poli-péptido de ActRIIB. El poli-péptido ActRIIB puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medios que contienen el poli-péptido ActRIIB. Alternativamente, el poli-péptido ActRIIB puede retenerse citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células cosechadas, lisadas y la proteína aislada. Un cultivo de células incluye las células huésped, los medios y otros sub-productos. Los medios aptos para los cultivos de células son bien conocidos en el arte. El objeto de los poli-péptidos ActRIIB puede ser aislados del medio de cultivo de las células, de las células huésped o de ambos, utilizando técnicas conocidas en el arte para purificar las proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración de genes, ultrafiltración, electroforesis y purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para los epítopes particulares de los poli-péptidos ActRIIB. En una incorporación preferencial, el poli-péptido ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

En otra incorporación, un gen de fusión codificando para una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de segmentación poli-(His)/enteroquinasa en el terminal-N de la porción deseada del poli-péptido ActRIIB recombinante, puede permitir purificación de la proteína de fusión expresada por afinidad de cromatografía utilizando una resina Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación puede entonces ser removida por tratamiento con enteroquinasa para suministrar el poli-péptido ActRIIB purificado (p. ej., ver Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Las técnicas para hacer genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN codificando para diferentes secuencias de poli-péptidos se hacen de acuerdo con técnicas convencionales utilizando terminales romas o escalonadas para ligados, restricción en

digestión de enzimas para proporcionar terminaciones adecuadas, llenando las finalizaciones cohesivas adecuadamente, tratamiento de fosfatasas para evitar uniones no deseables y ligado enzimático. En otra incorporación, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. De manera alterna, la amplificación PCR de fragmentos de gen puede lograrse utilizando cebadores de anclaje que da origen a salientes complementarios entre dos fragmentos de gene consecutivos que subsiguientemente pueden ser templados para generar una secuencia de genes quimérica (por ej. ver *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

5. [sic] Usos Terapéuticos Ejemplares

En ciertas incorporaciones, las composiciones (por ej. los poli-péptidos ActRIIB) del presente invento pueden utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad o condición que está asociada con actividad anormal de un poli-péptido ActRIIB y/o un ligando ActRIIB (p. ej. GDF8). Estas enfermedades, desórdenes o condiciones generalmente se denominan como "condiciones asociadas a ActRIIB". En ciertas incorporaciones, este invento proporciona métodos para un individuo que los necesite, de tratamiento o prevención al administrarle a éste una cantidad de poli-péptido ActRIIB efectiva terapéuticamente, como se describe más arriba. Estos métodos se dirigen particularmente a tratamientos terapéuticos y profilácticos para animales, y más específicamente para humanos.

Tal como se utiliza aquí, una terapia que "prevenga" un desorden o condición se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la ocurrencia del desorden o condición en la muestra tratada con relación a una muestra de control sin tratamiento, o demora el inicio o reduce la severidad de uno o más síntomas del desorden o condición con relación a la muestra de control sin tratamiento. El término "tratando" como se utiliza en este, incluye la profilaxis de la condición mencionada o la mejoría o la eliminación de la condición una vez que se ha establecido.

Los complejos ActRIIB/ligandos de ActRIIB juegan roles esenciales en el crecimiento de tejidos así como procesos de desarrollo temprano tales como la formación correcta de varias estructuras o en una o más capacidades post-desarrollo incluyendo el desarrollo sexual, producción de la hormona pituitaria y la creación de hueso y cartílago. Así, las condiciones asociadas con ActRIIB incluyen el crecimiento anormal de tejidos y defectos en el desarrollo. Adicionalmente las condiciones asociadas con ActRIIB incluyen, pero no se limitan a, desórdenes de crecimiento en las células y diferenciación tales como inflamación, alergia, enfermedades autoinmunes enfermedades infecciosas y tumores.

Las condiciones ejemplares para tratamiento incluyen desórdenes neuromusculares (p.ej., distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (y desgaste de los músculos asociados con EPOC), síndrome de desgaste muscular, sarcopenia, caquexia, desórdenes de tejido adiposo (p. ej., obesidad), diabetes tipo 2, y enfermedad degenerativa del hueso (p.ej., osteoporosis). Otras condiciones ejemplares incluyen desórdenes degenerativos del músculo y desórdenes neuromusculares, reparación de tejidos (p.ej. curación de heridas), enfermedades degenerativas (p.ej. esclerosis lateral amiotrófica), desórdenes inmunológicos (p. ej., desórdenes relacionados con la proliferación o función anormal de linfocitos) y obesidad o desórdenes relacionados con proliferación anormal de adipocitos.

En ciertas incorporaciones, las composiciones del invento (p. ej. los poli-péptidos ActRIIB-Fc) se usan como parte de un tratamiento para distrofia muscular. El término "distrofia muscular" se refiere a un grupo de enfermedades degenerativas del músculo caracterizado por debilitamiento y deterioro gradual del músculo esquelético y a veces de los músculos del corazón y de los respiratorios. Las distrofias musculares son desórdenes genéticos caracterizados por desgaste y debilidad progresiva de los músculos que comienzan con cambios microscópicos en el músculo. A medida que los músculos se degeneran a través del tiempo, la fuerza muscular de la persona se reduce. Las distrofias musculares ejemplares que pueden ser tratadas con un régimen que incluye el sujeto de

los poli-péptidos de ActRIIB, incluyen: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), Distrofia Muscular de Emery-Dreyfuss (EDMD), Distrofia Muscular de las Cinturas de las Extremidades (LGMD), Distrofia Muscular Facio-escápulohumeral (FSH o FSHD También conocida como Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotónica (MMD conocida también como Enfermedad de Steiner), Distrofia Muscular Óculo-faríngea (OPMD), Distrofia Muscular Distal (DD), Distrofia Muscular Congénita (CMD).

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) la describió por primera vez el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en los años de 1860. La Distrofia Muscular de Becker (BMD) llamada así por el doctor alemán Peter Emil Becker quien describió esta variante en los años de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en varones, afectando a uno en 3.500 niños. La DMD ocurre cuando el gen de distrofina, localizado en la parte corta del cromosoma X se rompe. Como los hombres solo llevan una copia del cromosoma X, solo tienen una copia del gene de distrofina. Sin la proteína de la distrofina, fácilmente se daña el músculo durante los ciclos de contracción y relajación. Mientras que temprano en la enfermedad el músculo se compensa por regeneración, más tarde las células progenitoras del músculo no pueden persistir con el daño continuo y el músculo sano se reemplaza por tejido fibro-adiposo no funcional.

La BMD resulta por mutaciones diversas del gen de distrofina. Los pacientes con BMD tienen alguna distrofina pero, o es insuficiente en cantidad o pobre en calidad. El que tenga algo de distrofina protege los músculos de BMD de degenerarse tan perjudicialmente o tan rápidamente como aquellos que tienen DMD.

Por ejemplo, investigaciones recientes demuestran que bloqueando o eliminando la función de GDF8 (un ligando de ActRIIB in vivo puede efectivamente tratar por lo menos ciertos síntomas en pacientes con DMD y BMD. Así el sujeto de los poli-péptidos de ActRIIB puede actuar como inhibidores (antagonistas) de GDF8 y constituyen un medio alternativo de bloquear las funciones de GDF8 y/o de ActRIIB in vivo en

pacientes con DMD y BMD. Este enfoque se confirma y se apoya por los datos demostrados en este, mientras que una proteína ActRIIB-Fc demostró que se incrementó la masa muscular en un ratón modelo de distrofia muscular.

De manera similar, el objeto de los poli-péptidos ActRIIB suministra un medio efectivo para aumentar la masa muscular en otras condiciones de enfermedad que necesitan crecimiento del músculo. Por ejemplo, ELA, también llamada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de la neurona motora) es un desorden CNS crónico, incurable y progresivo que ataca las neuronas motoras, componentes del CNS que conectan el cerebro con los músculos. En ELA, las neuronas motoras se degeneran y eventualmente mueren, y aunque el cerebro de la persona normalmente permanece funcionando plenamente y alerta, el comando para moverse nunca llega al músculo. La mayoría de personas que tienen ELA están en los 40 y 70 años. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son aquellas que van hacia los brazos o piernas.

Aquellos con ELA pueden tener problemas al caminar, dejan caer cosas, se caen, farfullan y se ríen o lloran incontrolablemente. Eventualmente, los músculos en las extremidades comienzan a atrofiarse por desuso. Esta debilidad muscular se convierte en debilitante y la persona necesitará una silla de ruedas o no podrá funcionar fuera de su cama. La mayoría de pacientes con ELA mueren por falla respiratoria o por complicaciones en la ventilación como pulmonía, 3 a 5 años desde el comienzo de la enfermedad. Este enfoque queda confirmado y apoyado por los datos que se demuestran en el presente, en donde una proteína ActRIIB-Fc demostró que mejoraba la apariencia, la masa muscular y el tiempo de vida en un modelo de ratón con ELA.

La masa muscular aumentada inducida por poli-péptido de ActRIIB puede también beneficiarse a aquellos que sufren de enfermedades de desgaste muscular. Gonzalez-Cadavid et al. (supra) reportaron que la expresión GDF8 se correlaciona inversamente con la masa magra en humanos y que la expresión aumentada del gen de GDF8 se asocia con la pérdida de peso en hombres con el síndrome de desgaste del SIDA. Al inhibir la función del GDF8 en pacientes con SIDA, por lo menos ciertos

síntomas del SIDA se pueden aliviar, si no eliminar completamente, mejorando así significativamente la calidad de vida de los pacientes con SIDA.

Como la pérdida de la función de GDF8 (un ligando de ActRIIB) también está asociada con pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes (Zimmers et al., supra; McPherron y Lee, supra), el sujeto de poli-péptidos ActRIIB puede ser utilizado también como agente terapéutico para retardar o prevenir el desarrollo de obesidad y de diabetes tipo II. Este enfoque queda confirmado y respaldado por los datos demostrados en el presente, mientras que una proteína ActRIIB-Fc demostró que mejora el estado metabólico de ratones obesos.

En ciertas incorporaciones, las composiciones (p. ej. los poli-péptidos de ActRIIB) del invento son utilizados como parte de un tratamiento de síndrome metabólico (conocido también como síndrome X y síndrome de resistencia a la insulina), que es una combinación de desórdenes y factores de riesgo que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo II. La mayoría de los 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 incorporaciones relacionadas, los poli-péptidos ActRIIB y otros compuestos del invento pueden ser utilizados como parte de un tratamiento de diabetes mellitus tipo II (conocido también como diabetes mellitus no dependiente de insulina o diabetes de comienzo en la adultez), que se caracteriza por glucosa elevada de la sangre en el contexto de resistencia a la insulina y relativa insuficiencia de insulina. Los cambios complejos y multifactoriales metabólicos en la diabetes, muy frecuentemente llevan a daños y deterioro funcional en muchos órganos, y más en el sistema cardiovascular. La diabetes mellitus tipo II se asocia frecuentemente con la obesidad (adiposidad abdominal o visceral), hipertensión, colesterol elevado y síndrome metabólico. Los factores de riesgo importantes para la diabetes mellitus tipo II incluyen,

envejecimiento, dietas con alto contenido de grasa y un estilo de vida sedentario.

En otras incorporaciones relacionadas, los poli-péptidos ActRIIB y otros compuestos del invento pueden utilizarse como parte del tratamiento de aterosclerosis, una condición inflamatoria crónica en la cual las paredes de las arterias se engrosan debido a acumulación de depósitos de grasa, generalmente conocidos como placas. Los factores de riesgo para la aterosclerosis incluyen el envejecimiento, la diabetes mellitus, las dislipoproteinemia, la obesidad (abdominal o visceral) y un estilo de vida sedentario.

Los poli-péptidos ActRIIB pueden también utilizarse para desórdenes de lipodistrofia que tienden a estar asociados con el síndrome metabólico. La resistencia severa a la insulina puede resultar de formas tanto genéticas como adquiridas de lipodistrofia, incluyendo en el último caso, el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) relacionado con la lipodistrofia en pacientes tratados con terapia antirretroviral.

El síndrome del cáncer anorexia-caquexia está entre los más debilitantes y letales aspectos del cáncer. La pérdida progresiva de peso en el síndrome anorexia-caquexia del cáncer es una característica común en muchos tipos de cáncer y es responsable no solo por una calidad de vida pobre y mala respuesta a la quimioterapia pero también por un tiempo de supervivencia más corto que lo que se encuentra en otros pacientes con tumores comparables sin pérdida de peso. La caquexia, asociada con la anorexia, con el desgaste del tejido muscular y graso, la angustia psicológica y una calidad de vida baja, surge de una interacción compleja entre el cáncer y el huésped. Es una de las causas más comunes de muerte entre los pacientes de cáncer y está presente en un 80% en el momento de la muerte. Es un ejemplo complejo del caos metabólico resultante en el metabolismo de la proteína, los carbohidratos y la grasa. Los tumores producen anormalidades tanto directas como indirectas resultantes en anorexia y pérdida de peso. Actualmente no existen tratamientos para controlar o revertir este proceso. El síndrome de anorexia-caquexia en cáncer afecta la producción

de citocina, libera los factores de movilización de lípidos y de inducción de proteólisis y alteraciones en metabolismo intermediario. Aunque la anorexia es común, la sola reducción en la ingesta de alimentos no es capaz de ser responsable por los cambios en la composición del cuerpo que se observa en los pacientes con cáncer, y el aumento en la ingesta de alimentos no puede reversar el síndrome de desgaste. Se debe sospechar de caquexia en pacientes con cáncer si una pérdida de peso involuntaria de más del cinco por ciento del peso pre-mórbido ocurre dentro de un período de seis meses.

Como se encontró que las sobreexpresiones de GDF8 en ratones adultos inducían a pérdida profunda de músculo y grasa, análogo a aquella que se observa en los síndromes de caquexia humana (Zimmers et al., Supra), el objeto de los poli-péptidos ActRIIB como compuestos farmacéuticos puede ser utilizado ventajosamente para prevenir, tratar o aliviar los síntomas del síndrome de caquexia, donde se quiera crecimiento del músculo.

En otras incorporaciones, este invento suministra métodos de inducir formación de hueso y/o cartílago, previniendo pérdida de hueso, incrementando la mineralización del hueso o previniendo la desmineralización de este. Por ejemplo, el objeto de poli-péptidos ActRIIB y los compuestos identificados en este invento tienen aplicación en el tratamiento de osteoporosis y la curación de fracturas de hueso y defectos de cartílagos en humanos y otros animales. Los poli-péptidos ActRIIB pueden ser útiles en pacientes a quienes se ha diagnosticado con densidad baja sub-clínica del hueso como medida de protección contra el desarrollo de osteoporosis.

En una incorporación específica, los métodos y compuestos del presente invento pueden encontrar utilidad médica en la sanación de fracturas de hueso y defectos de cartílagos en humanos y otros animales. Los métodos del objeto y los compuestos también pueden tener uso profiláctico en la reducción de fracturas abiertas y cerradas y también en la mejora en la fijación de articulaciones artificiales. La formación de hueso nuevo inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de resección congénita, inducida

por trauma o defectos cráneo faciales inducidos por oncología y también útil en cirugía plástica. Además, los métodos y compuestos del invento pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades periodónticas y en otros procesos de reparación dental. En algunos casos el objeto de poli-péptidos de ActRIIB puede proporcionar un ambiente para atraer células de formación ósea, estimular el crecimiento de células de formación ósea o inducir la diferenciación de progenitores de células de formación ósea. Los poli-péptidos de ActRIIB del invento pueden ser útiles también en el tratamiento de osteoporosis. Además, los poli-péptidos de ActRIIB pueden usarse en la reparación de defectos de cartílagos y la prevención/reversión de la osteoartritis.

En otra incorporación específica, el invento proporciona un método y compuesto terapéutico para reparar las fracturas y otras condiciones relacionadas con cartílago y/o defectos del hueso o enfermedades periodónticas. El invento también suministra métodos y compuestos terapéuticos para la curación de heridas y reparación de tejidos. Los tipos de heridas incluyen, pero no se limitan a, quemaduras, incisiones y úlceras. Ver p. ej., PCT Publication No. WO84/01106. Tales compuestos comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de por lo menos uno de los poli-péptidos de ActRIIB del invento en mezclas con un vehículo, portador o matriz farmacéuticamente aceptable.

En otra incorporación específica, los métodos y compuestos del invento pueden aplicarse a condiciones que causan pérdida de hueso, tal como la osteoporosis, el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Cushing, tirotoxicosis, estado diarreico crónico o malabsorción, acidosis tubular renal, falla renal crónica o anorexia nerviosa. Muchos saben que, siendo mujer, con bajo peso corporal y con un estilo de vida sedentario son factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de hueso, densidad mineral que conlleva a riesgos de fractura). Sin embargo, la osteoporosis también puede ser el resultado del uso a largo plazo de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante por drogas o por alguna otra condición médica se conoce como osteoporosis secundaria. En una condición llamada enfermedad de Cushing, la cantidad excesiva de cortisol producida por el cuerpo resulta en osteoporosis y fracturas.

Los medicamentos más comunes asociados con la osteoporosis secundaria son los cortico-esteroides, una clase de droga que actúa como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque se necesitan adecuados niveles de hormonas de la tiroides (producidas por la glándula tiroides) para el desarrollo esquelético, el exceso de esta hormona puede reducir la masa del hueso al pasar el tiempo. Los antiácidos que poseen aluminio pueden llevar a que haya pérdida de hueso cuando se toman en altas dosis en personas que tienen problemas de riñón, particularmente aquellos bajo diálisis. Otros medicamentos que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen la fenitoína (Dilantin) y los barbitúricos que se utilizan para prevenir convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Inmunex, Folex PFS), una droga para algunas formas de artritis, cáncer y desórdenes inmunológicos; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), una droga que se utiliza para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para suprimir el sistema inmunológico en pacientes con trasplante de órganos; agonistas de hormonas de luteinización que liberan hormonas (Lupron, Zoladex), utilizadas para tratamiento de cáncer en la próstata y en endometriosis; heparina (Calciparina, Liquemina), un medicamento anti-coagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), utilizada para tratar colesterol alto. La enfermedad en las encías conlleva a pérdida de hueso porque aquellas bacterias dañinas en nuestras bocas fuerzan a nuestros cuerpos a defendernos de ellas. La bacteria produce toxinas y enzimas bajo la línea de la encía, causando infección crónica.

En otras incorporaciones, este invento provee compuestos y métodos para regular la grasa corporal en el animal y para prevenir condiciones relacionadas con ello y particularmente condiciones que comprometen la salud relacionadas con ello. De acuerdo con este invento, para regular (controlar) el peso corporal puede referirse a reducir o incrementar la tasa de pérdida de peso y también incluye mantener activamente o sin cambios significativos el peso corporal (por ej. en contra de influencias externas o internas que de otra forma podrían incrementar o reducir el peso corporal).

Una incorporación de este invento se relaciona con la regulación del peso corporal al administrar un poli-péptido ActRIIB a un animal que lo necesite.

En una incorporación específica, este invento se relaciona con métodos y compuestos para la reducción de la masa grasa y/o reducir el incremento de la masa grasa en un animal, y particularmente para tratar o disminuir la obesidad en pacientes en riesgo de ello o que sufren de obesidad. En otra incorporación específica, este invento se dirige a métodos y compuestos para el tratamiento de un animal que es incapaz de ganar o retener el peso (por ej. un animal con un síndrome de desgaste). Tales métodos son efectivos para incrementar el peso y/o la masa corporal, o reducir el peso y/o la pérdida de masa o mejorar las condiciones asociadas con peso y/o masa corporal baja indeseable (por ej. poco saludable), o causadas por ello.

7. [sic] Compuestos farmacéuticos

En ciertas incorporaciones, los compuestos (esto es, los poli-péptidos ActRIIB) de este invento se formulan con un portador farmacéutico aceptable. Por ejemplo, un poli-péptido ActRIIB puede ser administrado solo o como el compuesto de una fórmula farmacéutica (compuesto terapéutico). Los sujetos del compuesto pueden ser formulados por administración de manera conveniente para el uso en humanos o en medicina veterinaria.

En ciertas incorporaciones, el método terapéutico del invento incluye la administración del compuesto tópica, sistémica o localmente como implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para el uso en este invento es, obviamente, en una forma aceptable fisiológicamente y libre de pirógenos. Además, la composición puede ser encapsulada o inyectada en forma viscosas para la entrega en el blanco de un sitio de tejido (esto es, hueso, cartílago, músculo, grasa o neuronas), por ejemplo en un sitio con daño en tejido. La administración tópica puede ser apta para sanar heridas y reparar tejidos. Los agentes útiles terapéuticamente diferentes a los poli-péptidos ActRIIB que pueden opcionalmente ser incluidos en el compuesto descrito atrás, pueden alternativa o adicionalmente ser administrados

simultáneamente o secuencialmente con el objeto de los compuestos (esto es, poli-péptidos ActRIIB) en los métodos del invento.

En ciertas incorporaciones, los compuestos de este invento pueden incluir una matriz capaz de dar uno o más compuestos terapéuticos (esto es, poli-péptidos ActRIIB) en un blanco del sitio del tejido, suministrando una estructura para el desarrollo del tejido y capaz óptimamente de ser reabsorbido por el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una lenta liberación de poli-péptidos ActRIIB. Tales matrices pueden formarse de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas de implante.

La escogencia de material de matriz está basada en biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular del objeto de los compuestos definirá la fórmula apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y químicamente definidas sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y poli-anhídridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y bien definidos biológicamente, tales como el colágeno del hueso o el dérmico. Otras matrices incluyen proteínas puras o componentes de matrices extra-celulares. Otras matrices potenciales no son biodegradables y definidas químicamente tales como la hidroxiapatitas, el biovidrio, los aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden incluir combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados más arriba, tales como el ácido poliláctico y la hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden alterarse en su composición tales como en el fosfato aluminato de calcio y procesadas para alterar el tamaño del poro, el tamaño de la partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas incorporaciones, los métodos del invento pueden administrarse oralmente, esto es en forma de cápsulas, cachets, píldoras, tabletas, pastillas (usando una base con sabor, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o

agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina o glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuague bucal y similares, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente puede también administrarse como bolo, electuario o pasta.

En formas de dosis sólida para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grajeas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de este invento pueden ser mezclados con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como el citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes tales como por ejemplo carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes como el 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) soluciones de agentes retardantes, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción tales como los compuestos de amoniaco cuaternarios; (7) agentes humectantes tales como el alcohol cetílico y el mono estearato de glicerol; (8) absorbentes tales como el caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, como talco estearato de calcio, estearato de magnesio, glicoles sólidos de polietileno, lauril-sulfato sódico y mezcla de éstos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas o píldoras, la composición farmacéutica puede también incluir agentes reguladores (de amortiguación). Los compuestos sólidos de una clase similar pueden también ser empleados como rellenos en cápsulas suaves y duras rellenas de gelatina utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, así como glicoles de polietileno de alto peso molecular, y similares.

Las formas de dosis líquidas para administración oral incluyen emulsiones aceptables farmacéuticamente, micro-emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. En adición al ingrediente activo, las formas de dosis líquida pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en el arte, tal como agua u otros disolventes, agentes de

solubilidad y emulsionantes tales como el alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato etílico, alcohol bencénico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1-3 butilenglicol, aceites (en particular aceites de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino, y de ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurilo, glicoles de polietileno y esterres de sorbitano de ácidos grasos y mezclas de ellos. Aparte de los diluyentes inertes, los compuestos orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, endulzantes, saborizantes, colorantes, aromatizantes y agentes preservativos.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, sorbitol polioxietileno, y esterres de sorbitano, celulosa micro-cristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de ellos.

Ciertos compuestos revelados en este pueden ser administrados tópicamente, ya sea a la piel o a las membranas mucosas. Las fórmulas tópicas pueden también incluir una o más de una variedad de agentes efectivos conocidos como potenciadores de penetración en la piel y el estrato córneo. Ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-Metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metilo o isopropílico, dimetil sulfóxido y azona. Se pueden incluir otros agentes adicionales para hacer que la fórmula sea cosméticamente aceptable. Ejemplos de esto son grasas, ceras, aceites, tinturas, fragancias, preservativos, estabilizantes y agentes activos de superficie. Los agentes queratolíticos tales como los conocidos en el arte también pueden ser incluidos. Ejemplos son el ácido salicílico y el sulfuro.

Formas de dosis para administración tópica o percutánea incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, placas e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador aceptable farmacéuticamente y con algunos de los preservativos, amortiguadores o propulsores que se requieran. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden

contener, adicionalmente al compuesto de sujeto del invento (por ejemplo un poli-péptido ActRIIB), excipientes, tales como grasa animal y vegetal, aceites, ceras, parafinas, almidones, tragacanto, derivados de celulosa, glicoles de polietileno, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o mezclas de estos.

Los polvos y aerosoles pueden contener, adicionales al compuesto del objeto, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamidas, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles adicionalmente pueden contener propulsores ordinarios tales como fluor-cloro-hidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos tales como butano y propano.

En ciertas incorporaciones, los compuestos farmacéuticos aptos para administración parenteral pueden incluir uno o más poli-péptidos ActRIIB en combinación con una o más soluciones estériles acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes de utilizarlas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostatos, solutos, que producen isotónica la formulación con la sangre del que va a ser el receptor o agentes de suspensión o espesamientos. Los ejemplos de portadores aptos acuosos y no acuosos que se pueden emplear en los compuestos farmacéuticos del invento incluyen agua, etano, polioles (tales como glicerol, glicol de propileno, glicoles de polietileno, y similares), y mezclas apropiadas de ellos, aceites vegetales tales como aceite de oliva y esterres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo con el uso de materiales de cobertura como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de la partícula requerida en el caso de las dispersiones y por el uso de surfactantes.

Los compuestos del invento pueden también contener adyuvantes tales como preservativos, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse con la

inclusión de varios agentes antibacterianos y anti-fúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol y similares. Puede ser deseable incluir agentes isotónicos como azúcares, cloruro de sodio y similares en los compuestos. Adicionalmente, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede obtenerse por la inclusión de agentes que pueden retardar la absorción tal como el mono estearato de aluminio y la gelatina.

Se entiende que el régimen de dosis quedará determinado por el médico tratante considerando varios factores que modifican la acción de los compuestos del objeto del invento (esto es los poli-péptidos ActRIIB). Los varios factores dependerán de la enfermedad a tratar.

En ciertas incorporaciones, este invento también proporciona terapia de genes para la producción in vivo de poli-péptidos ActRIIB u otros compuestos revelados en el presente. Dicha terapia logrará su efecto terapéutico al introducir las secuencias de los poli-nucleótidos de ActRIIB entre las células o tejidos que tienen los desórdenes listados más arriba. La entrega de las secuencias poli-nucleótidos ActRIIB pueden lograrse al usar un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. La entrega terapéutica preferida para las secuencias de poli-nucleótidos ActRIIB es el uso de liposomas al objetivo.

Se pueden utilizar varios vectores virales para terapia de genes como se enseña aquí incluyen el adenovirus, el virus del herpes, la vaccinia o preferiblemente un virus RNA como el retrovirus. Preferiblemente, el vector retrovirus es un derivado de un murino o retrovirus aviario. Los ejemplos de vectores retrovirales en los cuales un gen foráneo único puede insertarse, incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murino de Moloney (MMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV, y Virus del Sarcoma de Rous (RSV). Un número de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar genes múltiples. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador selectivo para que las células trasducidas puedan ser identificadas y generadas. Los

vectores retrovirales pueden ser específicos para un objetivo al adjuntar por ejemplo un azúcar, un glucolípido o una proteína. Los objetivos preferidos se logran con el uso de anticuerpos. Aquellos expertos en el arte reconocerán que las secuencias poli-nucleótidos específicas pueden ser insertadas dentro de un genoma retroviral o adjuntadas a una envoltura viral para permitir que se haga entrega específica del vector retroviral que contiene el poli-nucleótido ActRIIB al objetivo. En una incorporación preferida, el vector se dirige hacia las células/tejidos del hueso, cartílago, músculo o neurona.

De manera alterna, las células de cultivo de tejidos pueden ser directamente transfectadas con plásmidos codificando los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, por transfección convencional de fosfato de calcio. Estas células entonces se transfectan con el vector plásmido que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral dentro del medio del cultivo.

Otro sistema de envío al objetivo para los poli-nucleótidos AcRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nano-cápsulas, micro-esferas, burbujas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferente de este invento es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de entrega in vitro e in vivo. Los viriones intactos, el ARN y el ADN pueden ser en capsulados dentro del interior acuoso y entregados a las células de forma biológicamente activa (ver por ej., Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981), Los métodos eficientes para transferencia de genes utilizando un vehículo liposoma se conocen en el arte; ver por ej. Mannino et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma generalmente es una combinación de fosfolípidos, frecuentemente en combinación con esteroides, en especial el colesterol. Se pueden utilizar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fortaleza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidilos tales como el fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen la fosfatidilcolina, el dipalmitolfosfatidilcolina y el diestearolfosfatidilcolina. El objetivo de los liposomas también puede basarse en, por ejemplo, especificidad de órganos, especificidad de células y especificidad de organelas y es conocido en el arte.

EJEMPLIFICACIÓN

El invento que se describe ahora generalmente, puede ser más fácilmente comprensible por referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen simplemente para propósitos de ilustración de ciertas incorporaciones e incorporaciones de este invento y no tienen la intención de limitar el invento.

Ejemplo 1. Generación de ActRIIB(25-131)-hFc con Secuencias Nucleótidas Alternativas

Para generar la ActRIIB(25-131)-hFc, el dominio extracelular humano de ActRIIB con truncamientos (residuos 25-131 de la proteína nativa) de las terminales N y C se fusiona terminalmente la N con las secuencia líder TPA sustituida por el líder nativo ActRIIB y terminalmente la C con un dominio humano Fc vía un ligador mínimo (residuos de tres glicinas) (Figura 1). Una secuencia nucleótida codificando esta proteína de fusión aparece en la Figura 2. Los Solicitantes modificaron los codones y encontraron núcleos variantes de ácido nucleico codificando la proteína ActRIIB(25-131)-hFc que proporcionaba una mejoría sustancial en los niveles de los transformantes iniciales (Figura 3).

La proteína madura tiene una secuencia de aminoácido como aparece en seguida (el terminal-N confirmado con la secuencia del terminal-N) (SEQ ID NO:8):

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

Los aminoácidos 1-107 se derivan de ActRIIB.

La molécula expresada se purifica utilizando una serie de pasos de cromatografía en columna, incluyendo por ejemplo tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía sefarosa Q, cromatografía fenilsefarosa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio de cationes. La purificación puede completarse con filtración viral e intercambio de un regulador.

Ejemplo 2. Unión de Ligandos de Alta Afinidad por ActRIIB(25-131)-hFc

Las afinidades de varios ligandos por ActRIIB(25-131)-hFc y su completa contraparte (ActRIIB(20-134)-hFc se evaluaron in vitro con un instrumento Biacore™ y los resultados se resumen en la tabla siguiente. Los valores Kd se obtuvieron por afinidad de un estado estable apto debido a una muy rápida asociación y disociación del complejo que previno la determinación exacta de k_{on} y k_{off}. La ActRIIB(25-131)-hFc unió la activina A, la B y la GDF11 con alta afinidad. De manera intrigante, la ActRIIB(25-131)-hFc parece demostrar mayor afinidad por GDF3 que la ActRIIB(20-134)-hFc (los datos no aparecen).

Afinidades del Ligando de las Formas de ActRIIB-hFc:

Construcción de Fusión	Activina A (e-11)	Activina B (e-11)	GDF11(e-11)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(25-	1.8	1.2	3.1

131)-hFc			
----------	--	--	--

Ejemplo 3. La ActRIIB(25-131)-hFc Incrementa la Masa y la Fortaleza del Músculo In Vivo

Los Solicitantes investigaron la habilidad de la ActRIIB(25-131)-hFc para incrementar la masa y la fortaleza del músculo en el ratón. Los ratones machos (n= 10 por grupo) se trataron sub-cutáneamente dos veces a a la semana con el vehículo de solución salina amortiguada Tris o una de cinco dosis de ActRIIB(25-131)-hFc. Cuatro semanas de tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc produjeron un claro incremento dependiente de la dosis en la masa muscular magra (Figura 4), determinada por un escaneo de resonancia magnética (NMR)de cuerpo entero. El incremento en la masa muscular se confirmó al terminar el estudio para músculos específicos, incluyendo el pectoral (Figura 5), el femoral recto y el gastrocnemio. Más importante aún, el aumento en la masa muscular se acompañó de aumento en la fortaleza, como se pudo apreciar en la fortaleza del agarre comparada con el vehículo (Figura 6). Estos resultados proporcionan evidencia apremiante que la ActRIIB(25-131)-hFc incrementa tanto la masa muscular como la fortaleza muscular in vivo.

Ejemplo 4. La ActRIIB(25-131)-hFc Previene la Pérdida del Músculo en un Ratón Modelo de Carencia de Andrógenos

Los Solicitantes investigaron la habilidad de la ActRIIB(25-131)-hFc para prevenir pérdida muscular en un ratón modelo de carencia de andrógenos, una intervención terapéutica estándar para cáncer de próstata en hombres. Los ratones machos (n= 10 por grupo) fueron castrados (ORX) o con simulación de operación y tratados subcutáneamente dos veces a la semana con el vehículo TBS, la ActRIIB(25-131)-hFc a 10 mg/kg o su contraparte completa de murino ActRIIB(20-134)-mFc a 10 mg/kg. La masa magra de tejido fue definida con un escaneo de NMR de cuerpo completo. Los ratones castrados por cuatro semanas con cualquiera de las formas de ActRIIB-Fc mostraron incremento en la masa magra de tejido desde la línea base, que es muy significativo comparado con la reducción observada en los controles ORX sobre ese período (Figura 7). Un incremento análogo, muy significativo se observó bajo

condiciones de las gónadas intactas para ambas formas ActRIIB-Fc comparados con los controles simulados (Figura 7). Estos resultados demuestran que la ActRIIB(25-131)-hFc puede incrementar la masa de tejido magro (previene pérdida de músculo) tan efectivamente como su completa contraparte ActRIIB(20-134)-mFc en este modelo de carencia de andrógenos.

Ejemplo 5. La ActRIIB(25-131)-hFc Mejora la Composición del Cuerpo en un Ratón Modelo de Obesidad con Dieta Inducida.

Los Solicitantes también investigaron la habilidad del ActRIIB(25-131)-hFc para incrementar la masa muscular y reducir la masa grasa en un ratón modelo de obesidad con dieta inducida. A los ratones machos (n=10 por grupo) se les alimentó con una dieta estándar de comida o con una dieta alta en grasa y se les trató intra-peritonealmente dos veces a la semana con vehículo TBS o con ActRIIB(25-131)-hFc a 10 mg/kg. El tejido de masa magra y grasa se determinó por un escaneo completo del cuerpo por NMR. El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc de los ratones con dieta alta en grasa por cuatro semanas resultó en un incremento en el tejido de masa magra de más del 25% comparado con un incremento del 2% con el tratamiento de vehículo (Figura 8). Resultados similares se obtuvieron en ratones con la dieta controlada con el ActRIIB(20-134)-hFc comparados con el vehículo (Figura 8). Además, se encontró que con el tratamiento continuado se mejoró la adiposidad. En comparación con el vehículo, el tratamiento con la ActRIIB(25-131)-hFc por 12 semanas, redujo la masa grasa en aproximadamente la mitad en los ratones con la dieta alta en grasa así como en aquellos con la dieta de control (Figura 9).

Tomados en conjunto, esta información demuestra que la ActRIIB(25-131)-hFc puede ser utilizada para mejorar la composición del cuerpo in vivo bajo una variedad de condiciones, incluyendo carencia de andrógenos y la ingesta alta de grasa.

Ejemplo 6. La ActRIIB(25-131)-hFc Normaliza los Lípidos del Suero, la Insulina y la Adiponectina en Ratón Modelo de Obesidad por Dieta Inducida.

Los Solicitantes investigaron los efectos de la ActRIIB(25-131)-hFc en concentraciones de suero de lípidos importantes clínicamente, insulina, adiponectina y en otros puntos metabólicos en ratones machos alimentados con dieta alta en grasa. Los ratones de diez semanas de nacidos C57BL/6 se pesaron y se trataron con ActRIIB(25-131)-hFc (n=10) o con vehículo de solución salina amortiguada (TBS) (N=7) 2 veces a la semana a 10mg/kg, s.c., por 60 días. Durante este período, los ratones tuvieron acceso ilimitado a una dieta que contenía un 58% de grasa en lugar de la comida estándar que contenía 4.5% de grasa.

El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc causó una constelación de efectos metabólicos dignos de anotar. En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la ActRIIB(25-131)-hFc redujo las concentraciones patológicamente elevadas de suero de triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) (Figuras 10-13), en la mayoría de casos normalizando estos parámetros a niveles observados en ratones alimentados con una dieta estándar. Muy importante, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc también normalizó las concentraciones de insulina en ratones con dieta alta en grasa (Figura 14) e incrementó las concentraciones de adiponectina significativamente sobre aún aquellos ratones que estaban alimentados con una dieta estándar (Figura 15). La adiponectina es un bio-marcador de la composición del cuerpo, ya que los niveles se conoce varían inversamente con la masa grasa/obesidad y la adiponectina realza la sensibilidad de la insulina en tejidos objetivo. La ActRIIB(25-131)-hFc también redujo la concentración de suero de leptina, otro indicador grande del estado de adipocitos en casi un 50% ($P < 0.05$). Finalmente, los efectos mencionados anteriormente se acompañaron de cambios beneficiosos en la composición del cuerpo como se pudo determinar con la resonancia magnética nuclear (NMR) en la línea base y en el Día 48. Bajo condiciones de dieta alta en grasa, la masa de grasa total en los controles tratados con el vehículo se triplicó durante este período de 48 días y el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc redujo este incremento por casi un 40%. Al Día 48, la masa grasa total fue de un 27% del peso corporal en los ratones tratados con ActRIIB(25-131)-hFc, vs un 39% en

ratones de control, mientras que el tejido de masa magra fue del 59% del peso corporal en los ratones tratados con la ActRIIB(25-131)-hFc vs. Un 55% en los ratones de control. Así el resultado neto fue una composición del cuerpo más sano bajo condiciones con dieta alta en grasa.

Para los parámetros de suero anteriores, la ActRIIB(25-131)-hFc consistentemente mejoró el desempeño de la ActRIIB(20-134)-hFc que se evaluó también en este mismo estudio. Así la ActRIIB(25-131)-hFc mejoró los niveles de triglicéridos casi 6 veces más, los niveles de FFA casi el doble, los niveles de HDL casi cuatro veces más los niveles de insulina más del doble y los niveles de adiponectina casi 1.5 veces más como lo que hizo la ActRIIB(20-134)-hFc con la misma dosis.

Ejemplo 7. La ActRIIB(25-131)-hFc Induce a Propiedades Termogénéticas en la Grasa Blanca del Ratón Modelo de Obesidad Inducida por Dieta.

En el estudio descrito más arriba (Ejemplo 6), los Solicitantes también investigaron los efectos de la ActRIIB(25-131)-hFc en las propiedades termogénéticas del tejido adiposo blanco. Bajo condiciones de dieta alta en grasa, el tratamiento con la ActRIIB(25-131)-hFc desató cambios histológicos en un perfil de expresión genética en tejido adiposo que eran consistentes con capacidad termogénica. Como lo muestra la Figura 16, el examen histológico de la grasa blanca epididimal indicó que la ActRIIB(25-131)-hFc reducía el tamaño de la gota de lípido y causaba formaciones de racimos de adipocitos multiloculares que son un sello distintivo de grasa marrón. Además, el análisis inmunohistoquímico de este tejido reveló extensa inducción de citoplasma UCP1 tanto en los adipocitos multiloculares como los uniloculares como resultado del tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc (Figura 16).

Cambios significativos acompañaron estos cambios histológicos en la expresión de genes claves reguladores termogénicos y metabólicos en la grasa blanca epididimal, como lo determinó la RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction - reacción en cadena de transcripción de polimerasa reversa) cuantitativa. En ratones con dieta alta en grasa, el tratamiento con la ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles

de UCPI mRNA más de 60 veces comparados con el vehículo (Figura 7), un cambio especialmente impresionante ya que esta cepa de demostración en ratas mitigó seriamente la inducción de UCPI y adipocitos marrones dentro de los depósitos claves de grasa blanca comparado con otras cepas de ratas (Guerra et al., 1998, *J Clin Invest* 102:412-420; Xue et al., 2007, *J Lipid Res* 48:41-51). Adicionalmente, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles de mRNA codificando la sirtuina SIRT-1 (silent information regulator two, homolog 1 - regulador de información silenciosa dos, homólogo 1), un regulador máster sensible de energía (deacetilasa) que protege contra el daño metabólico inducido por una dieta alta en grasa (Pfluger et al., 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9793-9798) y está implicado como control importante en la movilización de ácidos grasos (Rodgers et al., 2008, *FEBS Lett* 582:46-53). Significativamente, el tratamiento con la ActRIIB(25-131)-hFc también incrementó los niveles de mRNA que codifican la PGC-1 α (proliferador perioxosoma del co-activador -1 α de receptor gamma), un objetivo bien documentado del SIRT-1 que, a su vez, controla la expresión de muchos genes necesarios para la biogénesis mitocondrial y la capacidad termogénica de tejido adiposo marrón (Uldry et al., 2006, *Cell Metab.*, 3:333-341). Notablemente, la expresión forzada del PCG 1 α en los adipocitos blancos han demostrado que inducen a un programa termogénico de expresión genética, incluyendo UCPI, que se asemeja mucho a aquella en los adipocitos marrones (Hansen et al., 2006, *Biochem J* 398:153-168). En este estudio, la ActRIIB(25-131)-hFc restauró la expresión PGC-1 α en el tejido adiposo blanco bajo condiciones de dieta alta en grasa a niveles que no se distinguían de aquellos en ratones alimentados con una dieta estándar.

Los cambios adicionales asociados con el tratamiento constituyen un vínculo prominente entre el perfil alterado de la expresión en el tejido adiposo blanco y los efectos benéficos hormonales y metabólicos. Así, en grasa blanca epididimal, la ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles de mRNA codificando el Foxo-1 (caja de forkead que contiene proteína o sub-familia 1), un factor de transcripción que es

al mismo tiempo un objetivo de SIRT-1 y un inductor clave de expresión de adiponectina (Qiao et al., 2006, J Biol Chem 281:39915-39924). Consistente con la inducción Foxo-1 mRNA, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc elevó los niveles de adiponectina mRNA en grasa blanca (figura 18), que ayuda a tener en cuenta los niveles circulantes aumentados de adiponectina mRNA (Figura 15, Ejemplo 6), realce de sensibilidad a la insulina en tejidos objetivos y concentraciones normalizadas de insulina (Figura 14, ejemplo 6) en estos animales. En resumen, el tratamiento de ActRIIB(25-131)-hFc bajo condiciones de dieta alta en grasa resultó en 1) cambios histológicos y un perfil de expresión de genes en el tejido adiposo blanco que eran consistentes con la capacidad termogénica, y 2) cambios beneficiosos en una amplia gama de parámetros hormonales y metabólicos.

Ejemplo 8. Efectos de la ActRIIB(25-131)-hFc en el Hígado y los Músculos de un ratón Modelo de Obesidad Inducida por Dieta

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD - non alcoholic fatty liver disease) es un espectro de desórdenes hepáticos cada vez más comunes que se consideran son manifestaciones hepáticas de síndrome metabólico y se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis), frecuentemente con efectos perniciosos. Un subgrupo de pacientes con NAFLD desarrollan una condición inflamatoria conocida como esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que puede progresar aún más a fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepato-celular (Perlemuter et al. 2007. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 3: 458-469).

En el estudio descrito arriba (Ejemplos 6-7) los Solicitantes investigaron si la ActRIIB(25-131)-hFc podría inhibir la esteatosis asociada con una dieta alta en grasas. Al finalizar el estudio, el tejido hepático de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa mostró grandes cantidades de gotas densamente rellenas de lípidos, como se pudo evaluar al teñirlas con Oil Red O, mientras que los ratones con dieta de alimentación estándar no mostraron evidencia de depósitos lípidos hepáticos (Figura 19). El tratamiento con la ActRIIB(25-131)-hFc casi completamente

reversó los depósitos lípidos hepáticos y normalizó la apariencia del tejido hepático a pesar de la dieta alta en grasas.

El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc también aumentó la masa muscular en este modelo de obesidad inducida por dieta, consistente con hallazgos en otros modelos (Ejemplos 3-5). Específicamente, la ActRIIB(25-131)-hFc incrementó la masa del pectoral en más de un 70% ($P < 0.001$), la masa del gastrocnemio en casi un 40% ($P < 0.001$) y la masa del femoral recto en más de un 25% ($P < 0.001$) comparada con los controles de dieta alta en grasa. Estos cambios en la masa muscular fueron acompañados con cambios en la expresión del gene del músculo, como se determinó en el tejido del gastrocnemio por RT-PCR. Comparado con los controles de dieta alta en grasa, la ActRIIB(25-131)-hFc incrementó los niveles de PCG-1 α y Foxo-1 mRNA cada uno por aproximadamente un 50% ($P < 0.05$) en el gastrocnemio.

Ejemplo 9. Efecto de la ActRIIB(25-131)-mFc en Grasa Visceral Blanca en Ratón Modelo de Obesidad Inducida por Dieta.

La acumulación de grasa visceral, opuesta a la grasa subcutánea, juega un papel crítico en el desarrollo de enfermedad cardiovascular y en desórdenes relacionados con la obesidad tal como la diabetes mellitus, la hiperlipidemia, la hipertensión y el síndrome metabólico (Matsuzawa et al., 2006, FEBS Lett 580:2917-2921). Debido a su localización, la grasa visceral (o inter-abdominal) tiene fácil acceso al hígado vía la circulación portal hepática donde podría ejercer influencia en el metabolismo, promover resistencia a la insulina y causar esteatosis. Por lo tanto, en un estudio similar a aquel descrito más anteriormente, (Ejemplos 6-8), los Solicitantes investigaron los efectos de la variante truncada ActRIIB(25-131)-mFc en las cantidades de grasa visceral vs. Grasa subcutánea abdominal bajo condiciones de dieta alta en grasa. Ratones de nueve semanas C57BL/6 fueron tratados con ActRIIB(25-131)-mFc ($n=20$) a 10 mg/kg s.c., o con vehículo de solución salina amortiguada con Tris (TBS) ($n=10$) dos veces a la semana por 60 días. Comenzando 7 días antes del inicio de la dosificación, los ratones tuvieron acceso ilimitado a una dieta que contenía un 58% de grasa en

lugar de la dieta estándar que contenía 4.5% de grasa. Un grupo adicional de ratones (n=10) mantenidos con una dieta estándar también se trató con vehículo TBS y con seguimiento como control de dieta. Los volúmenes de grasa se determinaron con microCT para un subgrupo de ratones (n=4 por grupo) cuyos porcentajes de grasa corporal tal como fue determinado con análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) fueron los más cercanos al grupo promedio (todos los ratones fueron analizados con NMR).

La grasa visceral y la grasa subcutánea abdominal variaron significativamente en tamaño con la dieta y el tratamiento de ActRIIB(25-131)-mFc. La reconstrucción tridimensional de las imágenes microCT obtenidas en parte por el estudio (35 días) demostraron que tanto los depósitos de grasa visceral como los de grasa subcutánea se expandieron como resultado de una dieta alta en grasa y que la ActRIIB(25-131)-mFc reversó casi completamente estos incrementos (Figura 20). Cuando se analizaron cuantitativamente a la conclusión del estudio, (60 días), el efecto de la ActRIIB(25-131)-mFc comparado con la sola dieta alta en grasa fue significativamente alta tanto para la grasa visceral (Figura 21) como para la grasa subcutánea abdominal (Figura 22).

Ejemplo 10: Efecto de la ActRIIB(25-131)-mFc en las Propiedades de la Grasa Marrón en un Ratón Modelo de Obesidad Inducida por Dieta.

En el estudio descrito en el Ejemplo 9, los Solicitantes también investigaron los efectos de la ActRIIB(25-131)-mFc en las propiedades de los depósitos de grasa marrón inter-escapular bajo condiciones de una dieta alta en grasa. Comparada con la dieta estándar, la dieta alta en grasa produjo varios cambios en los depósitos inter-escapulares de tejido adiposo marrón y el tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc o reversó completamente o casi completamente cada uno de estos cambios. Específicamente una dieta alta en grasa causó un agrandamiento pronunciado del depósito inter-escapular así como aclaró su color de rojo a rosado (Figura 23). Este agrandamiento inducido por la dieta reflejó un doblamiento de la masa (Figura 24) y una reducción en la densidad (Figura 25) de los depósitos de grasa marrón. La densidad de los

depósitos estaba determinada por la tomografía micro-computarizada (micro-CT) in situ por un grupo de ratones (n=4 por grupo) cuyos porcentajes de grasa corporal total, como lo determinó el análisis de resonancia magnética nuclear (NMR), eran los más cercanos al grupo promedio (todos los ratones fueron analizados con NMR). El tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc reversó completamente los cambios inducidos por la dieta en la masa grasa marrón (Figura 24) y densidad (Figura 25), mientras que reversó en gran parte los cambios inducidos por la dieta en tamaño y color del depósito (Figura 23). Estos resultados indicaron que, bajo condiciones de una dieta alta en grasa, la ActRIIB(25-131)-mFc en gran parte o completamente restaura las propiedades posibles de correlacionar con la función sana de la grasa marrón y así mejora la calidad de la grasa marrón mientras que reduce el tamaño global de los depósitos de grasa marrón.

Ejemplo 11. Efectos de la ActRIIB(25-131)-mFc en los Músculos, Huesos, Grasa y Hormonas Metabólicas en un Ratón Modelo de Envejecimiento.

La composición del cuerpo cambia con el envejecimiento de manera predecible. El decaimiento normal dependiente de la edad en la masa y fortalecimiento muscular, conocido como sarcopenia, comienza alrededor de los 30 años y se acelera luego de los 60 (Stenholm et al., 2008, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 11:693-700). La masa y la fortaleza ósea exhiben un decaimiento similar con la edad, llevando a un riesgo de osteoporosis en los mayores. La masa de grasa corporal total se incrementa con la edad hasta aproximadamente los 70 y declina en términos absolutos pero permanece en proporción más o menos constante de la masa corporal total (Cartwright et al., 2007, Exp Gerontol 42:463-471). Basados en la eficacia observada en otros modelos y descritos en este, los Solicitantes investigaron los efectos de la ActRIIB(25-131)-mFc en los niveles de músculo, hueso, grasa e insulina en un ratón modelo de envejecimiento. A ratones machos de diez y nueve meses C57BL/6 se les dio acceso ilimitado a dieta estándar y tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc (n=16) a 10 mg/kg s.c., o con vehículo TBS (n=15) dos veces a la semana por 8 semanas. Como marco de referencia, la expectativa promedio de vida en esta cepa de ratones se encontró

anteriormente que era de aproximadamente 27 meses bajo condiciones de dieta estándar (Turturro et al., 2002, J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57:B379-389).

El tratamiento con la ActRIIB(25-131)-mFc generó una serie de cambios notables en la composición del cuerpo y efectos hormonales metabólicos en estos ratones envejecidos. Como lo determinó el análisis de NMR de todo el cuerpo, la masa de tejido magro esencialmente quedó sin cambios en los ratones de control a lo largo del estudio, mientras que en los ratones tratados con ActRIIB(25-131)-mFc se incrementó progresivamente hasta casi un 20% por encima de la línea base por 7 semanas (Figura 26). Consistente con este efecto en el cuerpo completo, la ActRIIB(25-131)-mFc también incrementó significativamente la masa de los grupos musculares individuales, incluyendo el pectoral (se incrementó en un 55%), el femoral recto (40%), el tríceps (40%) y el gastrocnemio (28%), comparado con los controles de tratamiento con vehículo a las 8 semanas. Más importante aún, el tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc mejoró la función neuromuscular como se determinó con la prueba de fortaleza en el agarre de la extremidad de acuerdo con un protocolo establecido.

(http://jaxservices.jax.org/phenotyping/gripstrength_protocol.html) (Figura 27)

Varios parámetros relacionados con el hueso mejoraron con el tratamiento de ActRIIB(25-131)-mFc en ratones envejecidos. Como lo determina el análisis DEXA en la línea base a los puntos de tiempo de las 8 semanas, la ActRIIB(25-131)-mFc incrementó la densidad mineral de los huesos del total del cuerpo a lo largo del estudio, mientras que los controles prácticamente no tuvieron cambios (Figura 28). Adicionalmente, los análisis de microCT de la tibia proximal demostraron que el tratamiento con la ActRIIB(25-131)-mFc por 8 semanas doblaron la fracción del volumen del hueso de la tibia proximal comparada con los controles ($P < 0.01$).

La ActRIIB(25-131)-mFc ejerció grandes efectos en los ratones envejecidos. Como lo determinó el análisis de NMR en múltiples puntos de tiempo, hubo una reducción progresiva de la masa grasa total del cuerpo en los controles tratados con

vehículo sobre el curso del estudio (Figura 29), consistente con hallazgos de humanos de avanzada edad. El tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc aceleró este cambio, causando la reducción de dos veces la magnitud observada en los controles (-44% vs -19%, respectivamente) (Figura 29). Para el punto de tiempo terminal, la ActRIIB(25-131)-mFc significativamente redujo la masa de los depósitos individuales epididimales, inguinales y retroperitoneales de grasa blanca por cantidades que oscilaban entre 48%-54%. De manera interesante, el tratamiento con la ActRIIB(25-131)-mFc también redujo la masa de los depósitos de grasa marrón inter-escapular por casi un 45% ($P < 0.05$), similar a los resultados obtenidos para este tejido en el ratón modelo de obesidad (Ejemplo 10). Finalmente, como lo determinó el análisis por microCT en un subgrupo representativo de ratones ($n=4$) de cada grupo, el ActRIIB(25-131)-mFc redujo el volumen del componente visceral de grasa abdominal en un 65% ($P < 0.01$) y el componente subcutáneo de la grasa abdominal por un 49% ($P < 0.01$). De aquí que el compartimiento de grasa visceral crítica fue el objetivo de la ActRIIB(25-131)-mFc en este modelo de envejecimiento.

La ActRIIB(25-131)-mFc también produjo cambios benéficos en hormonas metabólicas importante en los ratones envejecidos. Ocho semanas de tratamiento con ActRIIB(25-131)-mFc casi dobló las concentraciones circulantes de adiponectina ($P < 0.001$) y redujo las concentraciones circulantes de insulina en más de un 40% (Figura 30). Una concentración de insulina en ayuno elevado (hiperinsulinemia) es una medida extensamente aceptada de sustitución de resistencia a la insulina (Weyer et al., 2000, Diabetes 49:2094-2101), y las concentraciones aumentadas de adiponectina contribuyen posiblemente a mejorar la sensibilidad a la insulina en este estudio. Las concentraciones de hemoglobina glicosilada (A1C) se redujeron significativamente por la ActRIIB(25-131)-mFc en este estudio (Figura 31), por lo tanto suministrando evidencia adicional para la regulación de glucosa mejorada con el tratamiento de la ActRIIB(25-131)-mFc en este modelo de envejecimiento.

Ejemplo 12: Efecto de la ActRIIB(25-131)-hFc en Tejido Magro en un Ratón Modelo de Caquexia de Cáncer

La caquexia es una pérdida de peso no deseada por pérdida de tejido muscular y adiposo. Muchos tumores se asocian con la pérdida del apetito y grave pérdida de músculo y los pacientes con caquexia tienen un pronóstico más desfavorable que aquellos que no la tienen. Como la línea de células de cáncer CT26 induce a una caquexia profunda en ratones, la ActRIIB(25-131)-hFc se probó en este ratón modelo para los efectos potenciales en caquexia inducida por xeno-injerto. A los ratones BALB/c de ocho semanas de edad se les inyectó subcutáneamente con células de adeno-carcinoma 10^6 Colon-26 (CT26) por ratón. Dos semanas después del implante del tumor, se inició el tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc (n=15), a 10 mg/kg, s.c., o vehículo de solución salina amortiguada con Tris (TBS) (n=13) dos veces a la semana. Grupos adicionales de ratones BALB/c no recibieron las células CT26 pero fueron tratados con ActRIIB(25-131)-hFc o con el vehículo mencionado arriba. El tratamiento con ActRIIB(25-131)-hFc resultó en un aumento significativo de peso corporal que se mantuvo a lo largo del estudio. A las cinco semanas luego del implante del tumor, los ratones tratados con el vehículo mostraron una pérdida de un 7% en el tejido de la masa magra desde la línea base, como lo determinó el análisis de NMR, mientras que los ratones tratados con la ActRIIB(25-131)-hFc exhibieron un incremento del 27% en la grasa magra desde la línea base (Figura 32). La masa grasa no difirió significativamente entre los grupos. Estos resultados demostraron que la ActRIIB(25-131)-hFc puede aliviar la caquexia en ratones con cáncer y puede ser una terapia efectiva para tratar la caquexia en pacientes con cáncer.

En conjunto, estos datos indican que la proteína de fusión ActRIIB(25-131)-hFc puede ser utilizada como un antagonista de señalización por ligandos de la familia TGF para reversar muchos cambios patológicos metabólicos asociados con la obesidad inducida por dieta y, por lo tanto, para tratar las condiciones metabólicas exacerbadas por una ingesta alta en calorías. Además, la ActRIIB(25-131)-hFc puede utilizarse para tratar los cambios metabólicos asociados con el envejecimiento o con la caquexia del cáncer.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en este se incorporan por referencia en su totalidad como si cada publicación individual o patente fuera indicada específica e individualmente incorporada por referencia.

Mientras que las incorporaciones específicas del objeto han sido tratadas, la especificación arriba mencionada es ilustrativa y no restrictiva. Para aquellos expertos en el arte muchas de las variaciones serán aparentes al revisar esta especificación y las reivindicaciones que aparecen más adelante. El alcance completo del invento se determinará por referencia a las reivindicaciones, junto con el alcance pleno de equivalentes y la especificación junto con dichas variaciones.

Reivindicaciones:

1. Un ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones astringentes al complemento de los nucleótidos 73-396 de SEQ ID NO:6.
2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, donde el ácido nucleico incluye los nucleótidos 73-396 de SEQ ID NO:6.
3. Un ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones astringentes al complemento de los nucleótidos 73-396 de SEQ ID NO:4.
4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, donde el ácido nucleico incluye los nucleótidos 73.396 de SEQ ID NO:4.
5. Una célula cultivada que incluye el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. La célula cultivada de la reivindicación 5, donde la célula es una mamífera.
7. La célula cultivada de la reivindicación 5, donde la célula es un CHO.
8. Un poli-péptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - a. un poli-péptido que incluye una secuencia de aminoácidos donde la secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de SEQ ID NO:8 o una secuencia de aminoácidos que difiere en no más de cinco posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO:8;
 - b. un poli-péptido producido por la expresión de una célula mamífera del ácido nucleico de SEQ ID NO:4 o un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones astringentes con el complemento de éste;
 - c. un poli-péptido producido por la expresión de una célula mamífera del ácido nucleico de SEQ ID NO:6 o un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones astringentes con el complemento de éste.
9. El poli-péptido de la reivindicación 8, donde el poli-péptido es un poli-péptido de la parte (a).

10. El poli-péptido de la reivindicación 8, donde el poli-péptido es un poli-péptido de la parte (b).
11. El poli-péptido de la reivindicación 8, donde el poli-péptido es un poli-péptido de la parte (c).
12. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-11 donde el término del amino del poli-péptido tiene la secuencia ETR.
13. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-12 donde el poli-péptido causa un incremento estadísticamente significativo en la masa magra corporal en un ratón luego de cuatro semanas de tratamiento, dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg.
14. El poli-péptido de la reivindicación 13, donde el promedio de incremento de masa de tejido magro es de por lo menos 2 g.
15. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-14 donde el poli-péptido causa una reducción estadísticamente significativa en la masa de grasa de un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg.
16. El polio-péptido de la reivindicación 15 donde la reducción promedio de masa de grasa es de por lo menos 5 g.
17. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-16, donde el poli-péptido causa una reducción estadísticamente significativa en los niveles de suero de triglicérido en un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg,
18. El poli-péptido de la reivindicación 17 donde el promedio de reducción de los triglicéridos es de por lo menos un 50 mg/dl.

19. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-18 donde el poli-péptido causa una reducción estadísticamente significativa en los niveles del ácido graso libre del suero en un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg.
20. El poli-péptido de la reivindicación 19, donde el promedio de reducción de los ácidos grasos libres es de por lo menos 500 micro-moles/dl.
21. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-20, donde el poli-péptido causa una reducción estadísticamente significativa de los niveles de suero de insulina en un ratón alimentado con una dieta alta en grasa luego de cuatro semanas de tratamiento dos veces a la semana con un nivel de dosis de 10 mg/kg.
22. El poli-péptido de la reivindicación 21, donde la reducción promedio de insulina es de por lo menos 1 ng/ml.
23. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-22, donde el poli-péptido incluye por lo menos un azúcar vinculado-N.
24. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-23 donde el poli-péptido se produce en una célula CHO.
25. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-24, donde el poli-péptido se asocia covalentemente a un segundo poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-24.
26. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-24, donde el poli-péptido es covalentemente asociado con un segundo poli-péptido para formar un homo-dímero.
27. Un poli-péptido que incluye una porción derivada de una ActRIIB y una o más porciones heterólogas, donde la

proteína derivada de la ActRIIB incluye una secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:1 en no más de cinco posiciones de aminoácido.

28. El poli-péptido de la reivindicación 27, donde la porción heteróloga incluye un dominio constante de una inmunoglobulina.
29. El poli-péptido de la reivindicación 27 donde la porción heteróloga incluye un dominio Fc de una inmunoglobulina.
30. El poli-péptido de la reivindicación 27, donde la porción heteróloga incluye un dominio Fc de un IgGI humano.
31. El poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 27-30 donde la porción derivada de la ActRIIB incluye una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:1.
32. Una preparación farmacéutica que incluye el poli-péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8-31.
33. Un método para tratar un sujeto que tiene un desorden asociado con pérdida de músculo o insuficiente crecimiento del músculo, que incluye administrar al sujeto una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de la reivindicación 32.
34. Un método para incrementar la masa magra o reducir la tasa de pérdida de masa magra en un sujeto que lo necesita, que incluye administrar al sujeto una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de la reivindicación 32.
35. Un método para reducir el contenido de la masa grasa o reducir la tasa de incremento del contenido de grasa en un sujeto, que incluye la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una preparación farmacéutica de la reivindicación 32.

36. Un método para tratar un desorden asociado con ganancia de peso corporal indeseada en un sujeto, que incluye la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una preparación farmacéutica de la reivindicación 32.
37. Un método para tratar un desorden metabólico en un sujeto, que incluye la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una preparación farmacéutica de la reivindicación 32.
38. El método de la reivindicación 37, donde el paciente tiene una o más de las siguientes características:
- d. Niveles elevados de suero de triglicéridos;
 - e. Niveles elevados de ácido graso libre; o
 - f. Niveles elevados de suero de insulina.
39. El método de la reivindicación 37 o 38 donde el desorden metabólico se escoge de un grupo que consiste en: diabetes tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y obesidad.

Resumen:

Bajo ciertos aspectos, el presente invento proporciona compuestos que contienen poli-péptidos que se derivan del ActRIIB para regular (fomentar o inhibir) el crecimiento de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo, grasa, tejido adiposo marrón y/o tejido neuronal y para el tratamiento de desórdenes metabólicos tales como diabetes y obesidad así como desórdenes asociados con cualquiera de los tejidos anteriores.

1/34

MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAA~~IT~~TREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV
YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLEPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

FIGURA 1

2/34

ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

 A E T R E C I Y Y
 AGTCTTGGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
 TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

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

 S G T I E L V K K G C W L D D F
 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
 ACTGTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
 TGACGATGCT ATCCGTCCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 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
 GCCAGAGGCT GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
 CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

 GTGGAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 CGTCCCTACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

FIGURA 2

CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 4)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 5)

FIGURA 2 CONT.

4/34

ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

 A E T R E C I Y Y
 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCGGAAAC CCGCGAATGT ATTATTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGCTTTG GCGCCTTACA TAAATAATGT

 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 ATGCTAATTG GGAACCTGAA CCGACGAACC AATGCGGGCT GGAACGGTGT
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 GAGGGGGAAC AGGATAAAGC CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
 CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

 S G T I E L V K K G C W L D D F
 CTCCGGGACG ATTGAACCTG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GAGGATTTCA
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT

 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
 TAACAATACT GCGGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 TATTTCTGTT GTTGGGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TACCCACCT
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTAAGTGGCA AATGGGTGGA

 P E A G G P E V T Y E P P P T
 CCCCGAAGCC GCGGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCCACCGGTG
 GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

 GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

FIGURA 3

AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 6)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 7)

FIGURA 3 CONT.

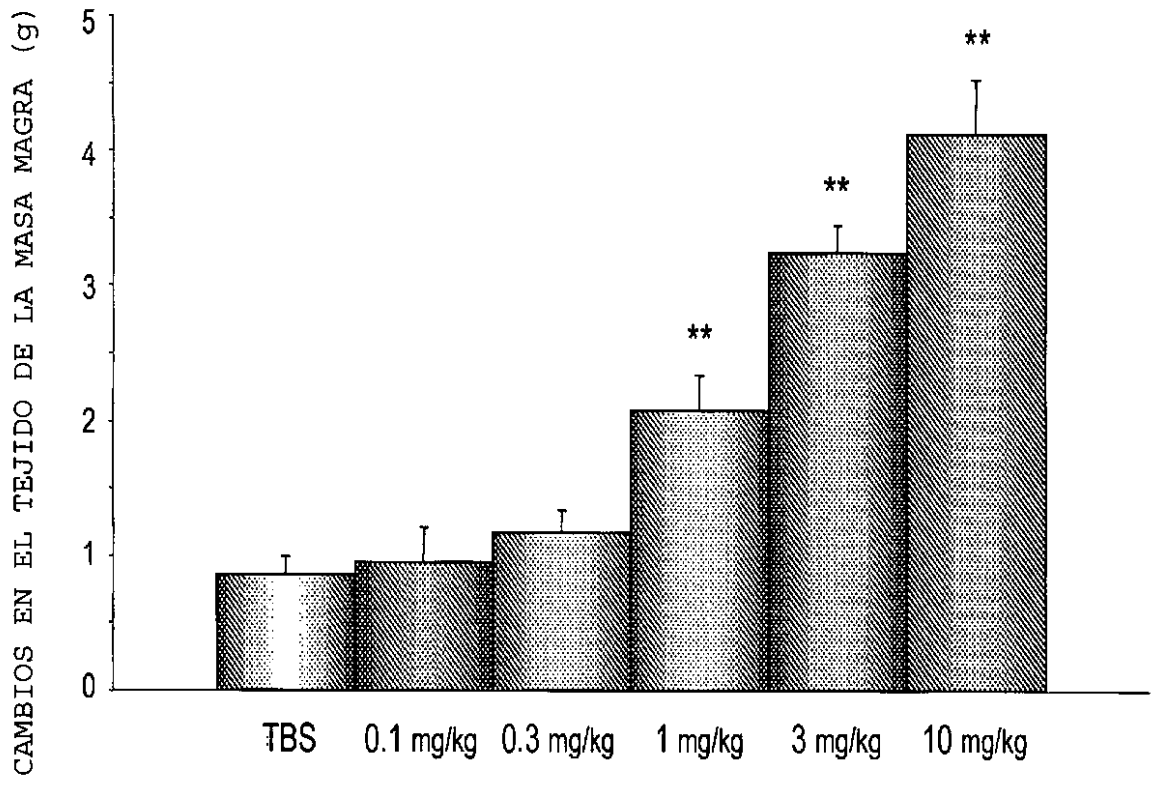


FIGURA 4

7/34

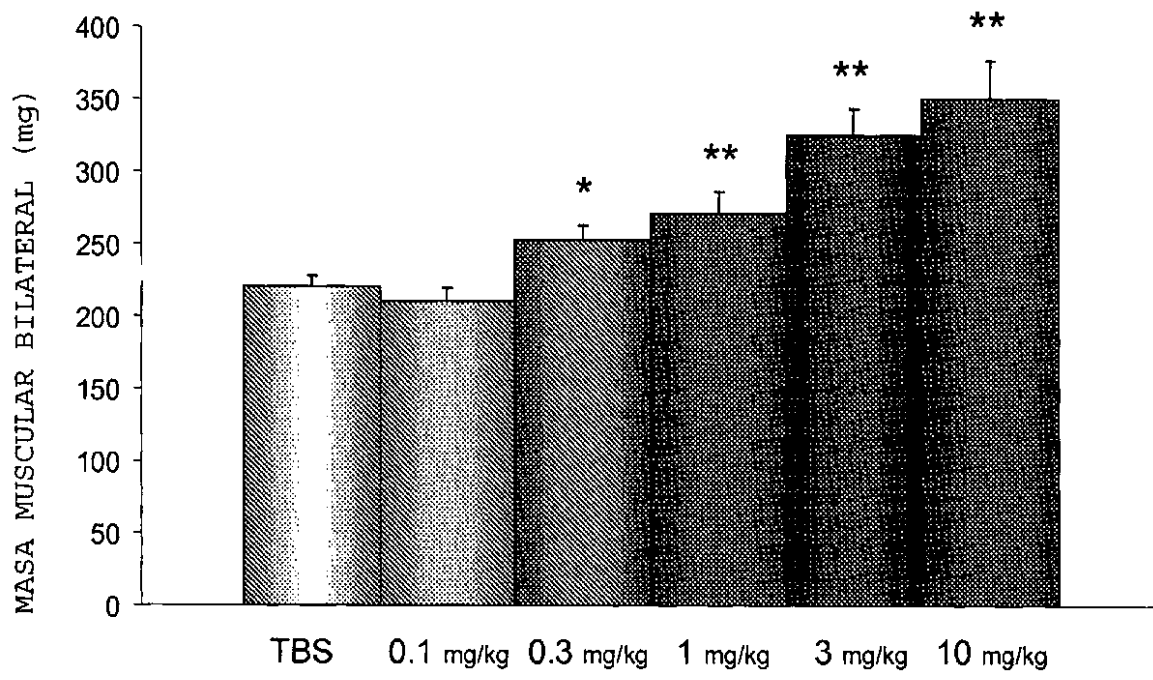


FIGURA 5

8/34

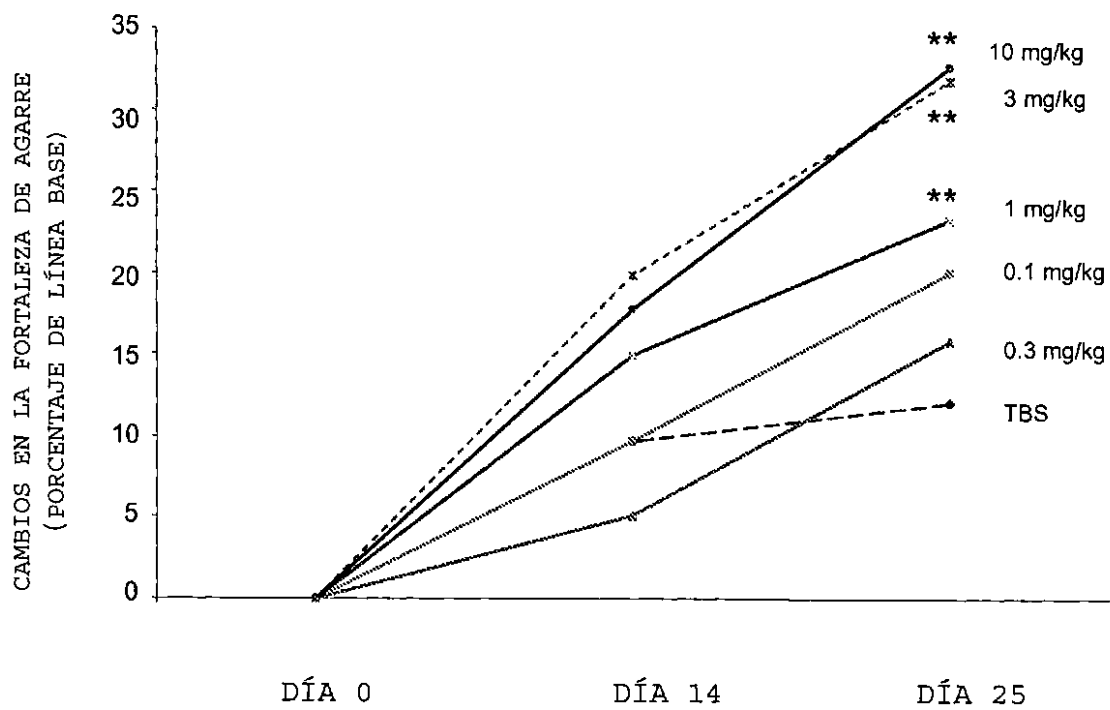


FIGURA 6

9/34

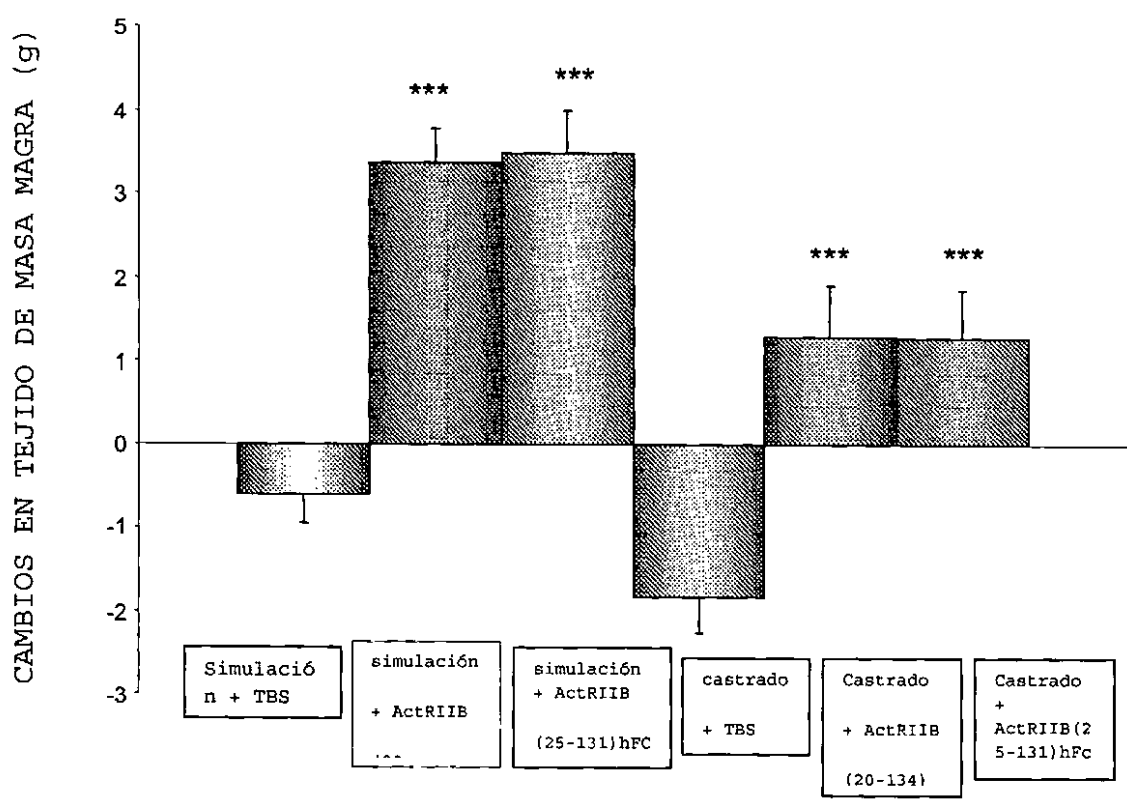


FIGURA 7

10/34

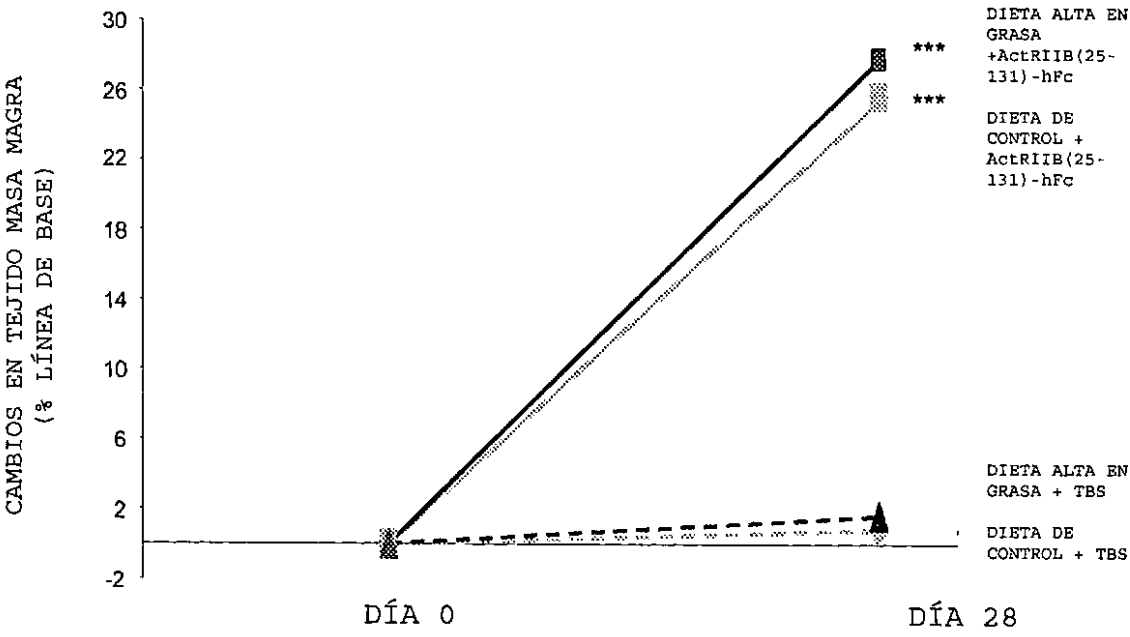


FIGURA 8

11/34

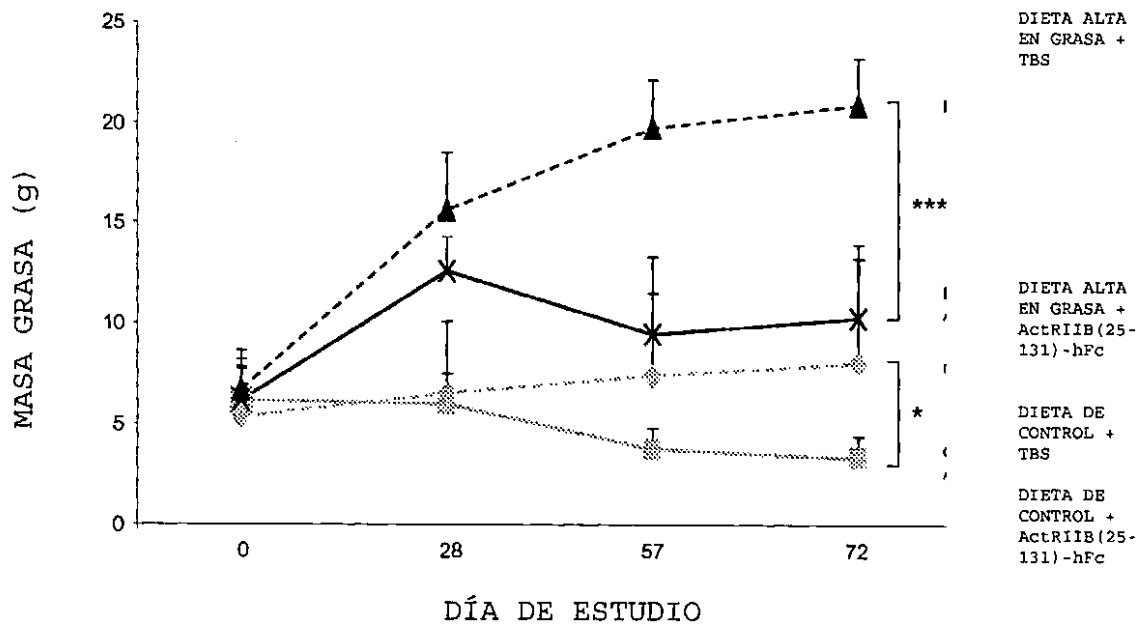


FIGURA 9

12/34

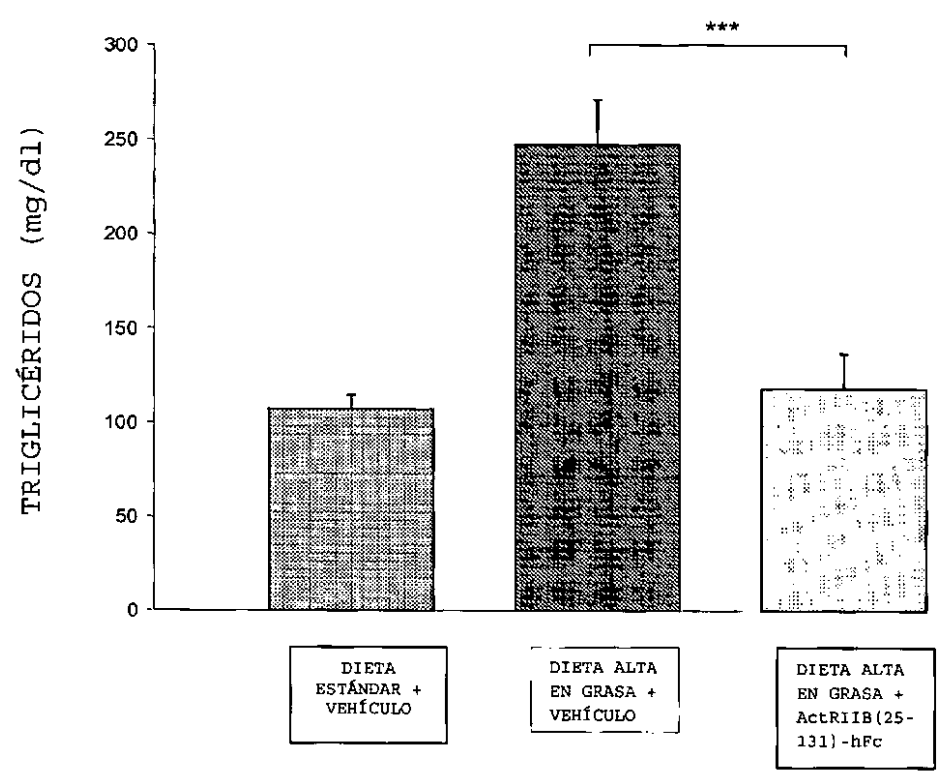


FIGURA 10

13/34

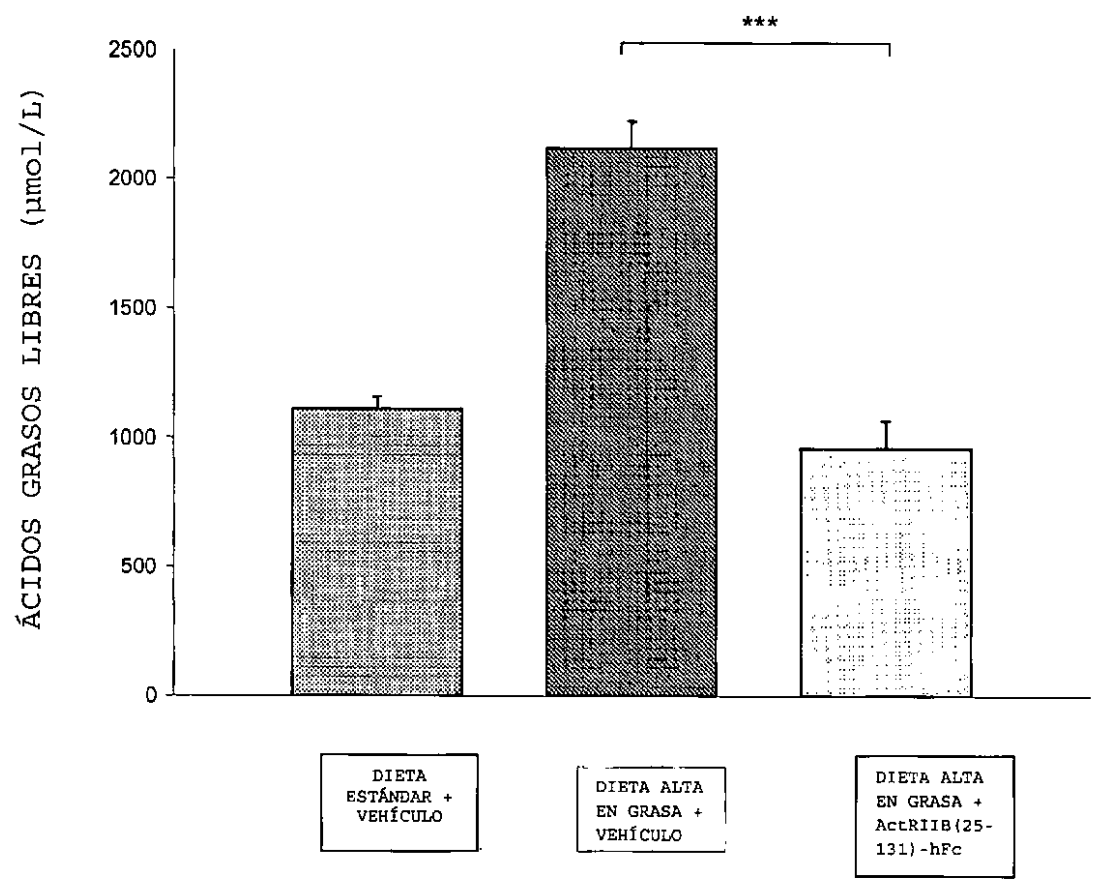


FIGURA 11

14/34

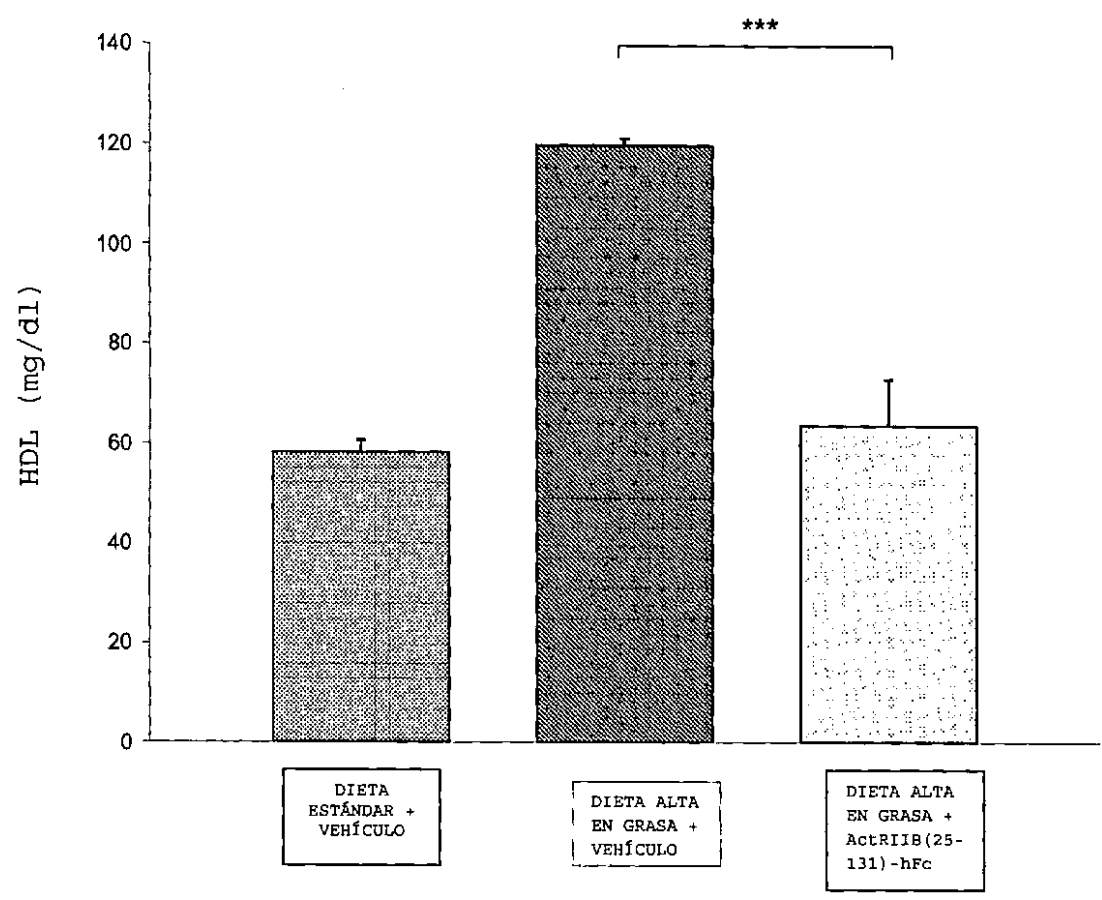


FIGURA 12

97

15/34

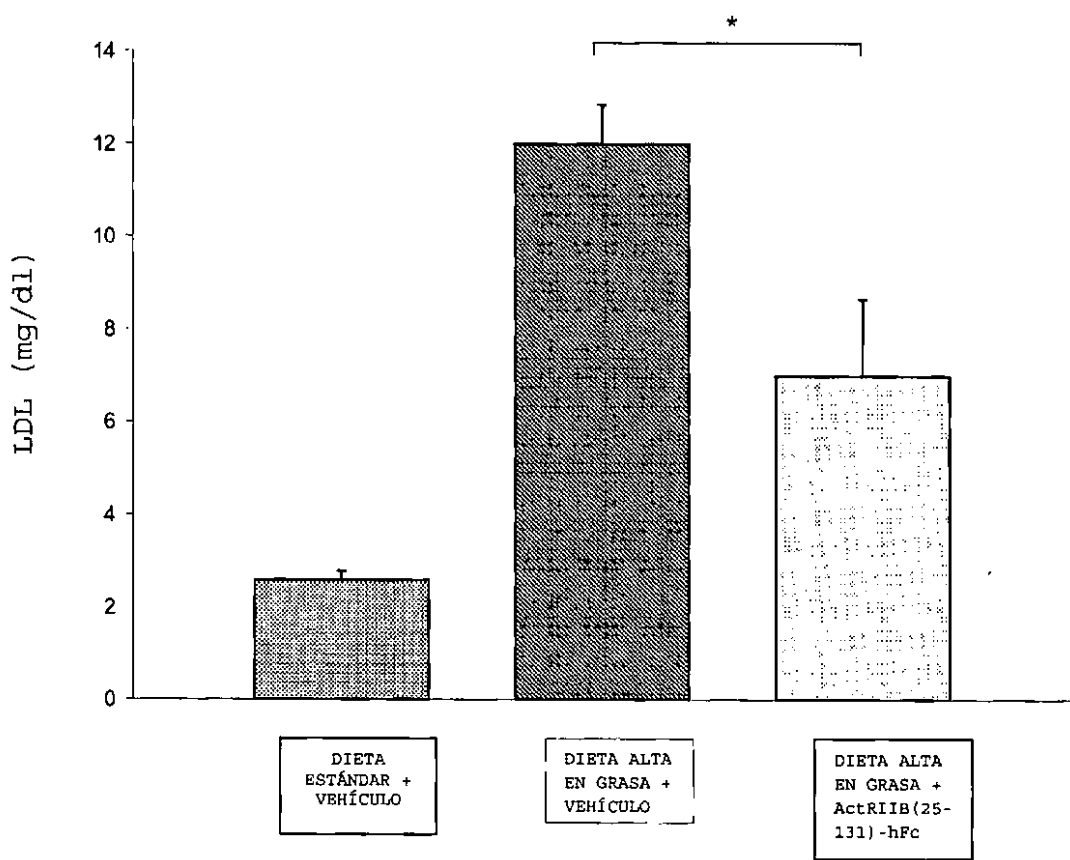


FIGURA 13

98

16/34

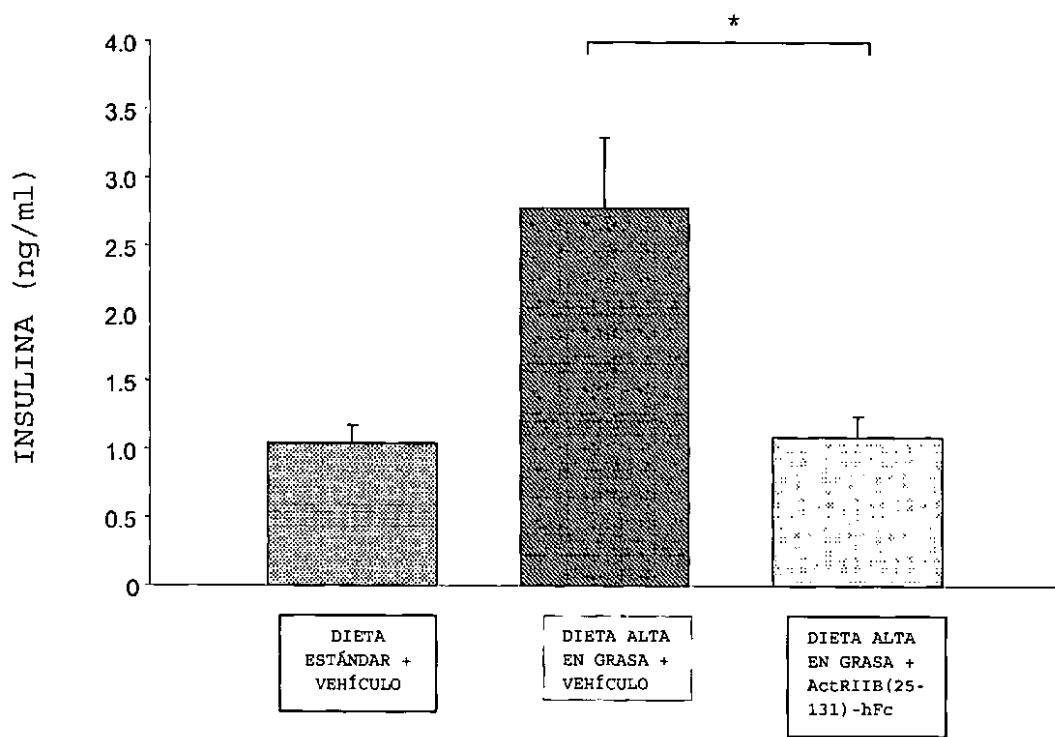


FIGURA 14

17/34

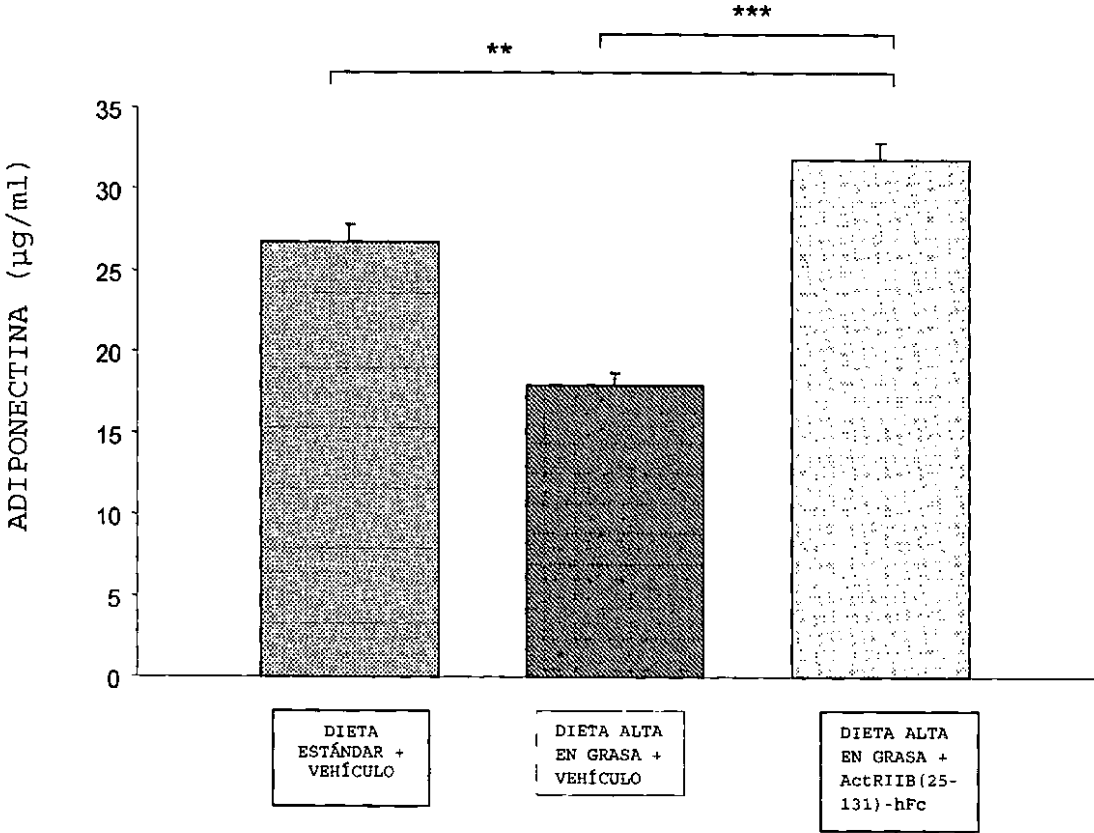


FIGURA 15

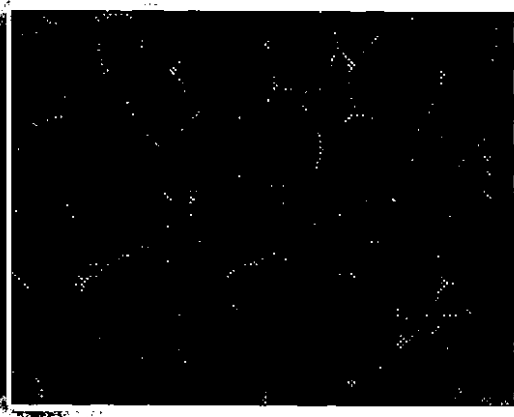
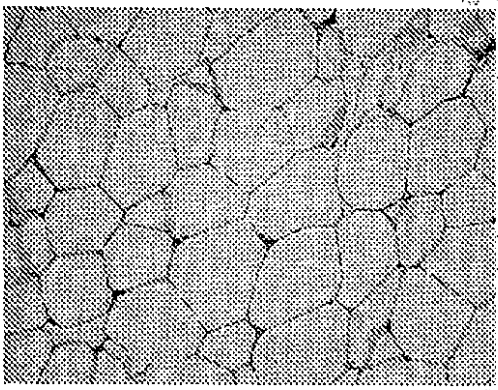
18/34

100

H& E

UCP1

DIETA ALTA EN GRASA + VEHÍCULO



DIETA ALTA EN GRASA + ActRIIB(25-131)-hFc

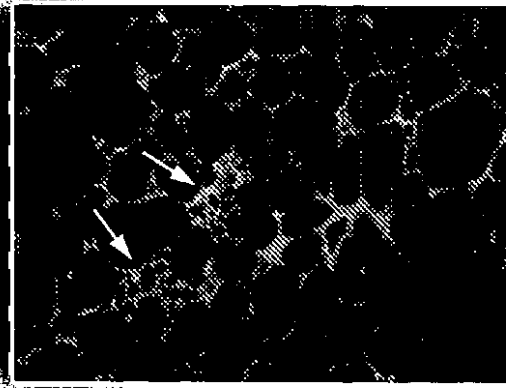
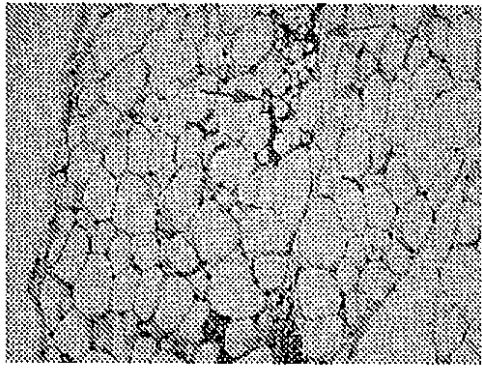


FIGURA 16

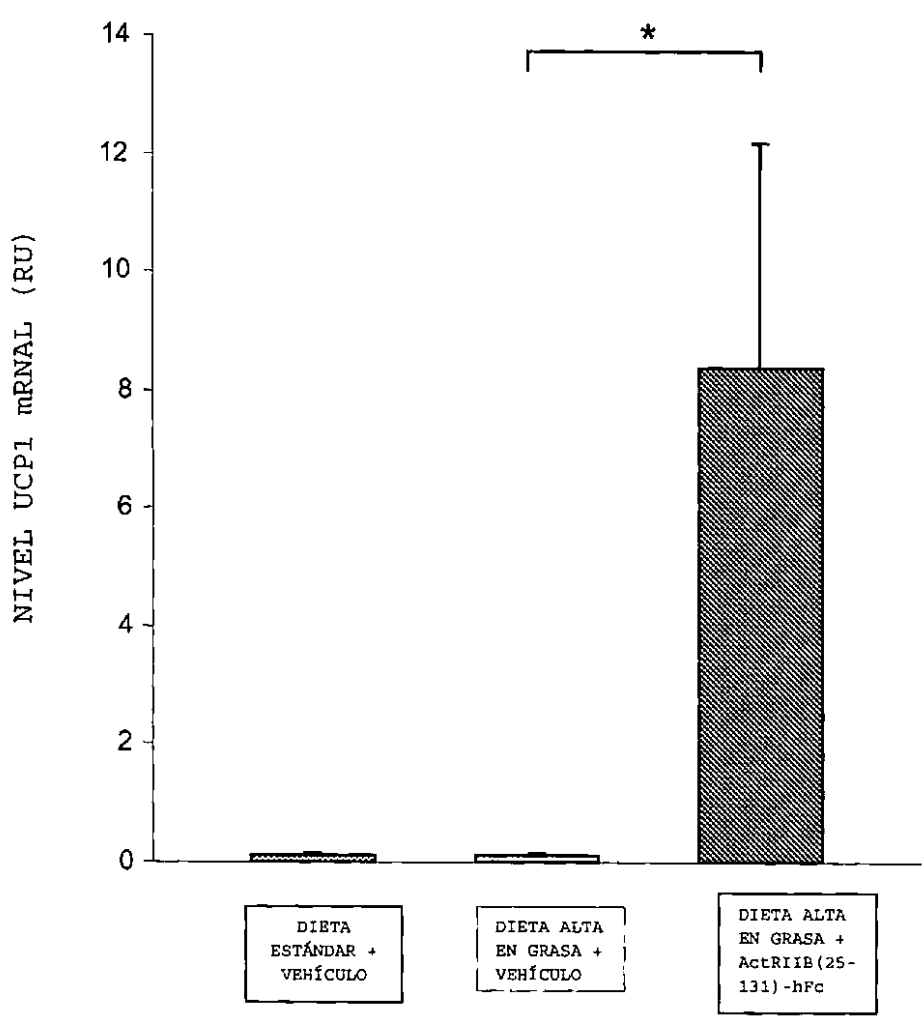


FIGURA 17

102

20/34

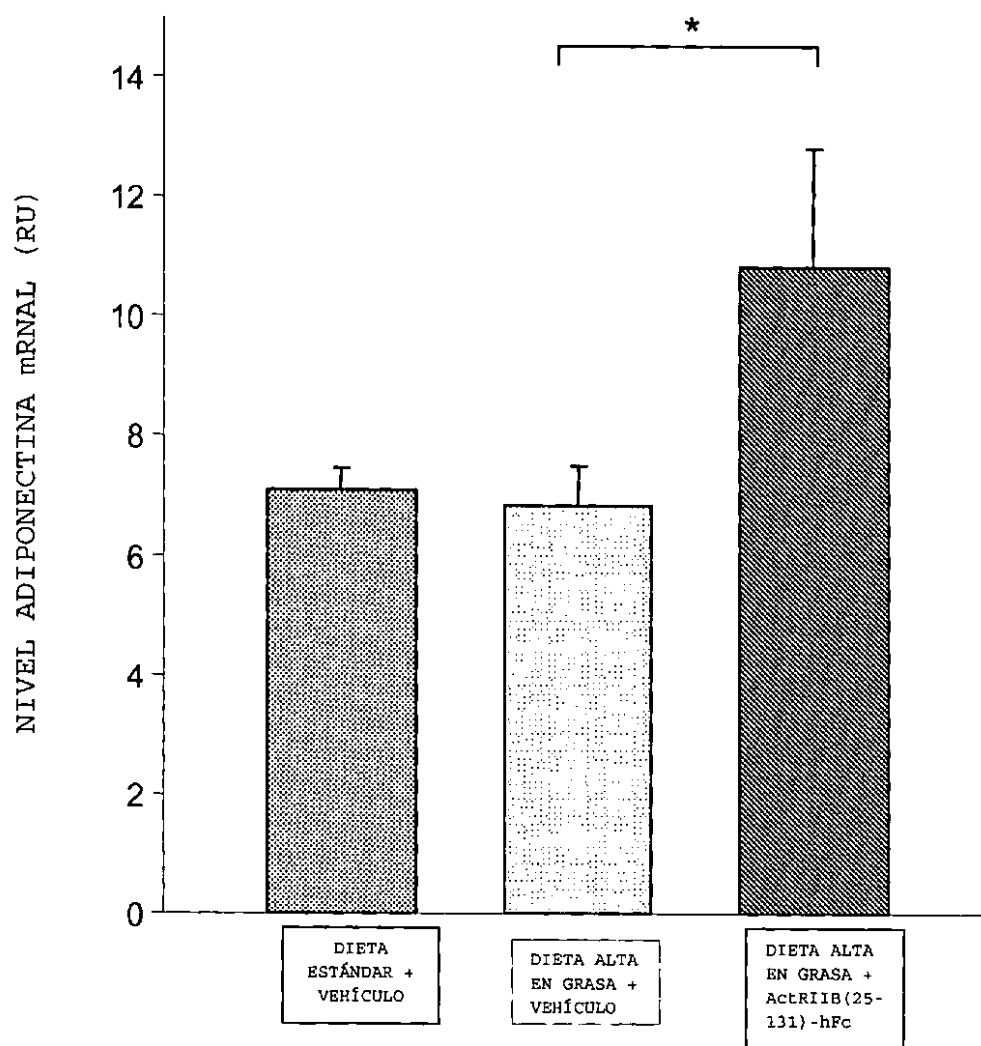
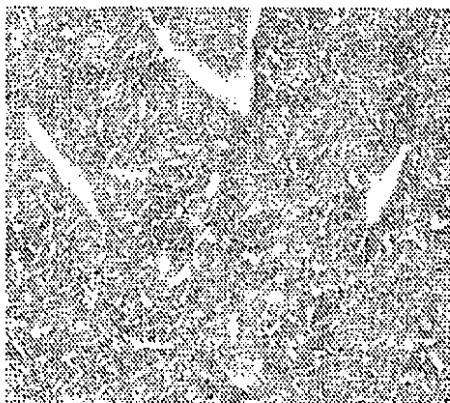
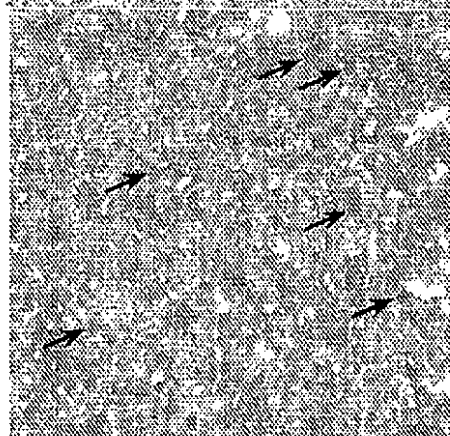


FIGURA 18

DIETA ESTÁNDAR +
VEHÍCULO



DIETA ALTA EN GRASA +
VEHÍCULO



DIETA ALTA EN GRASA +
ActRIIB(25-131)-hFc

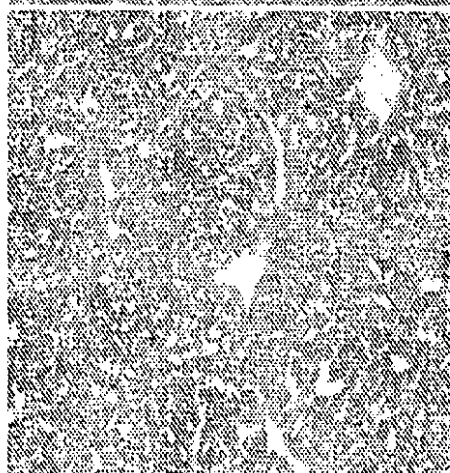


FIGURA 19

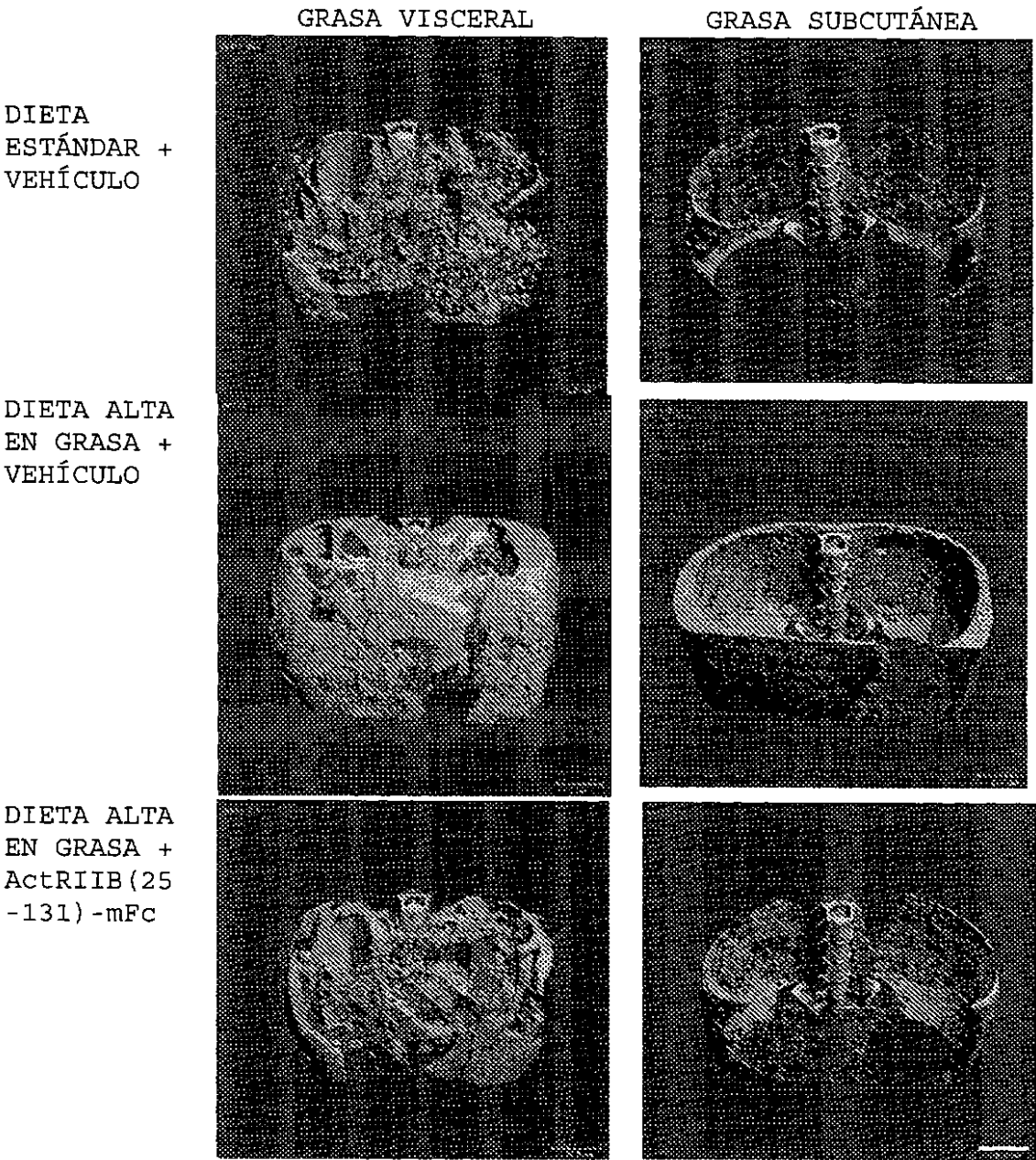


FIGURA 20

23/34

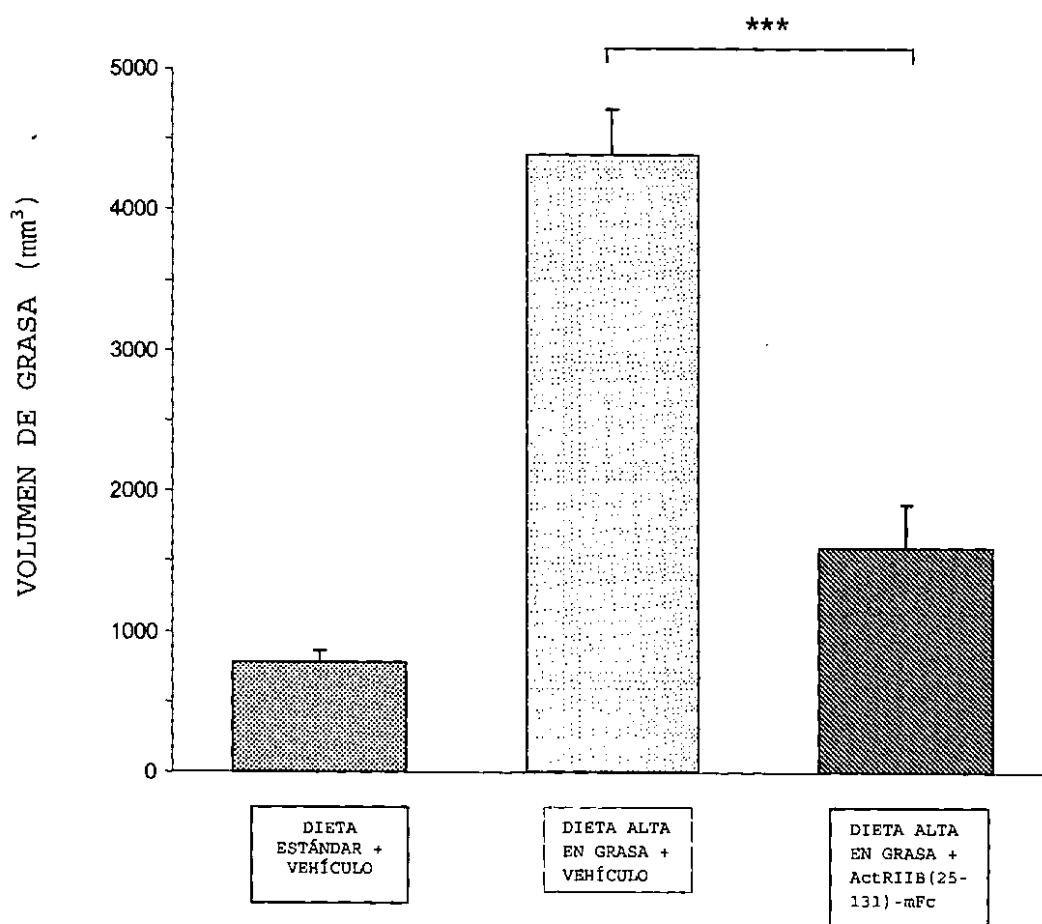


FIGURA 21

24/34

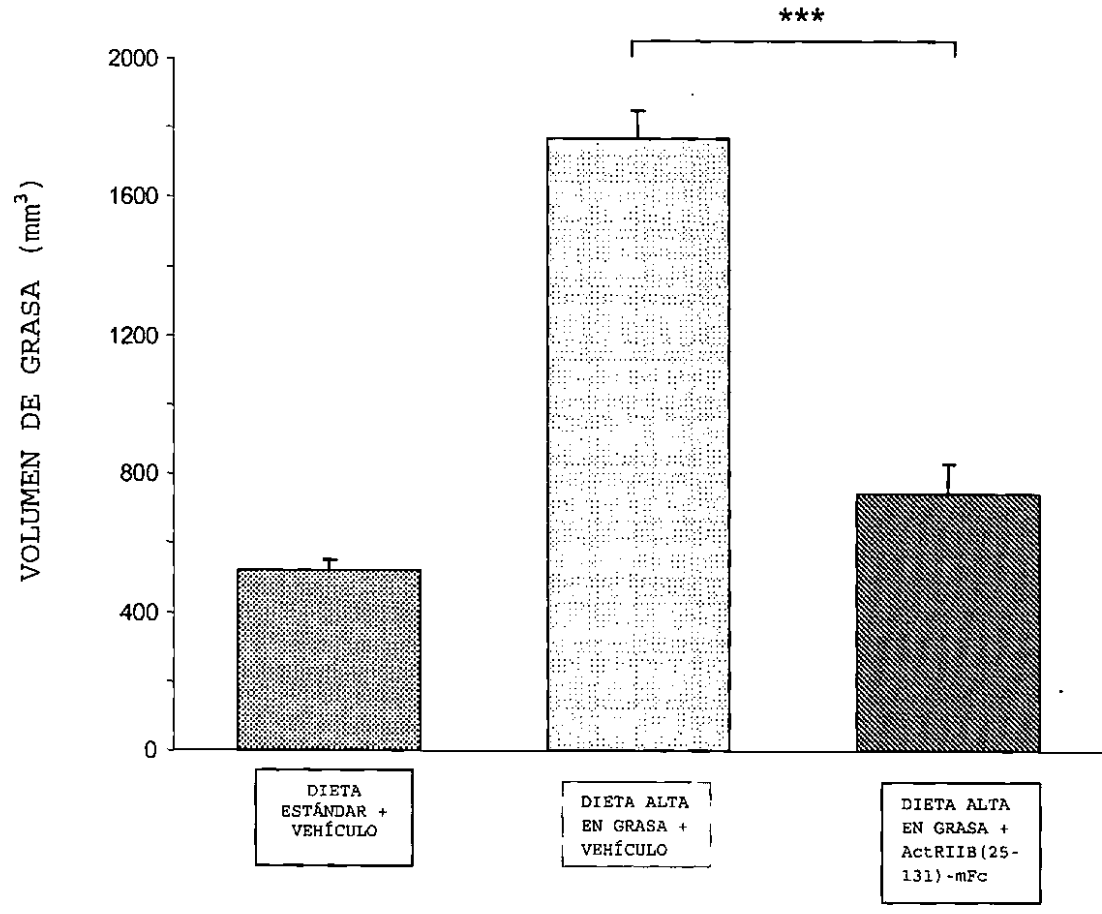
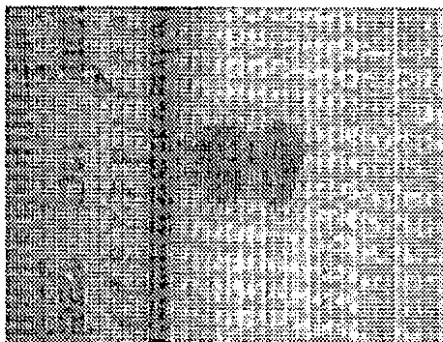


FIGURA 22

107

25/34

DIETA ESTÁNDAR +
VEHÍCULO



DIETA ALTA EN GRASA +
VEHÍCULO



DIETA ALTA EN GRASA +
ActRIIB (25-131) -mFc

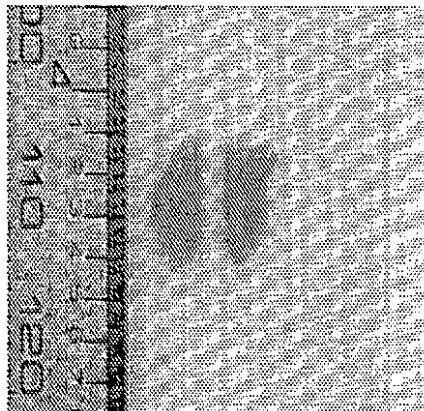


FIGURA 23

108

26/34

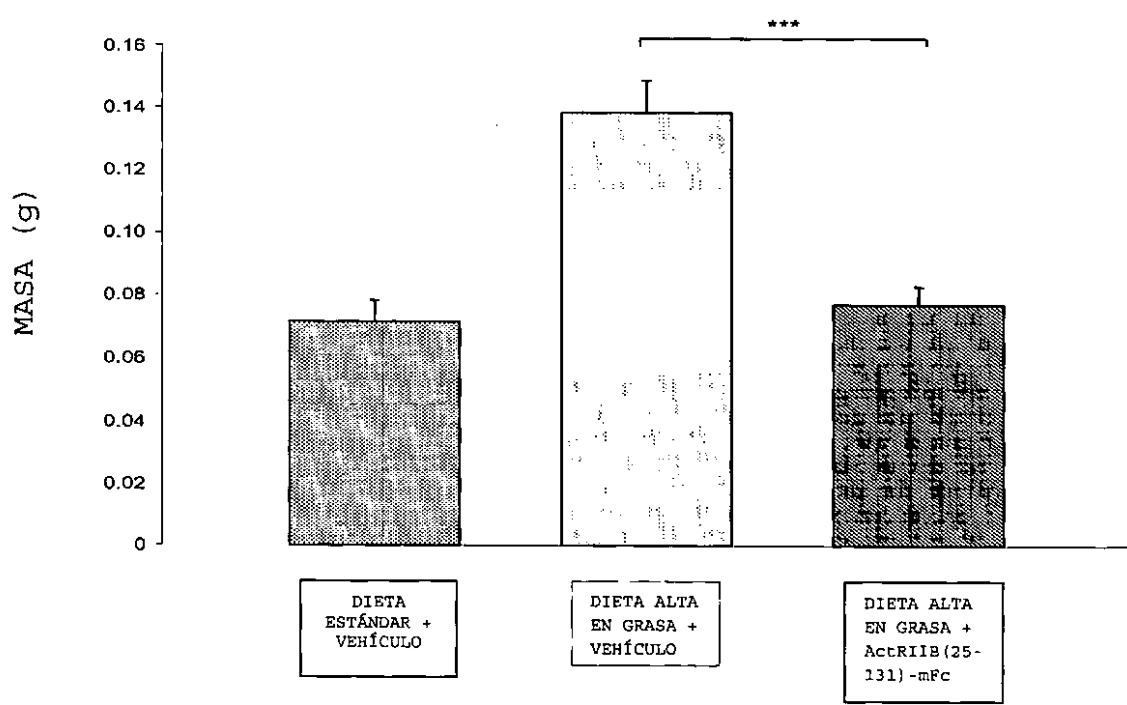


FIGURA 24

109

27/34

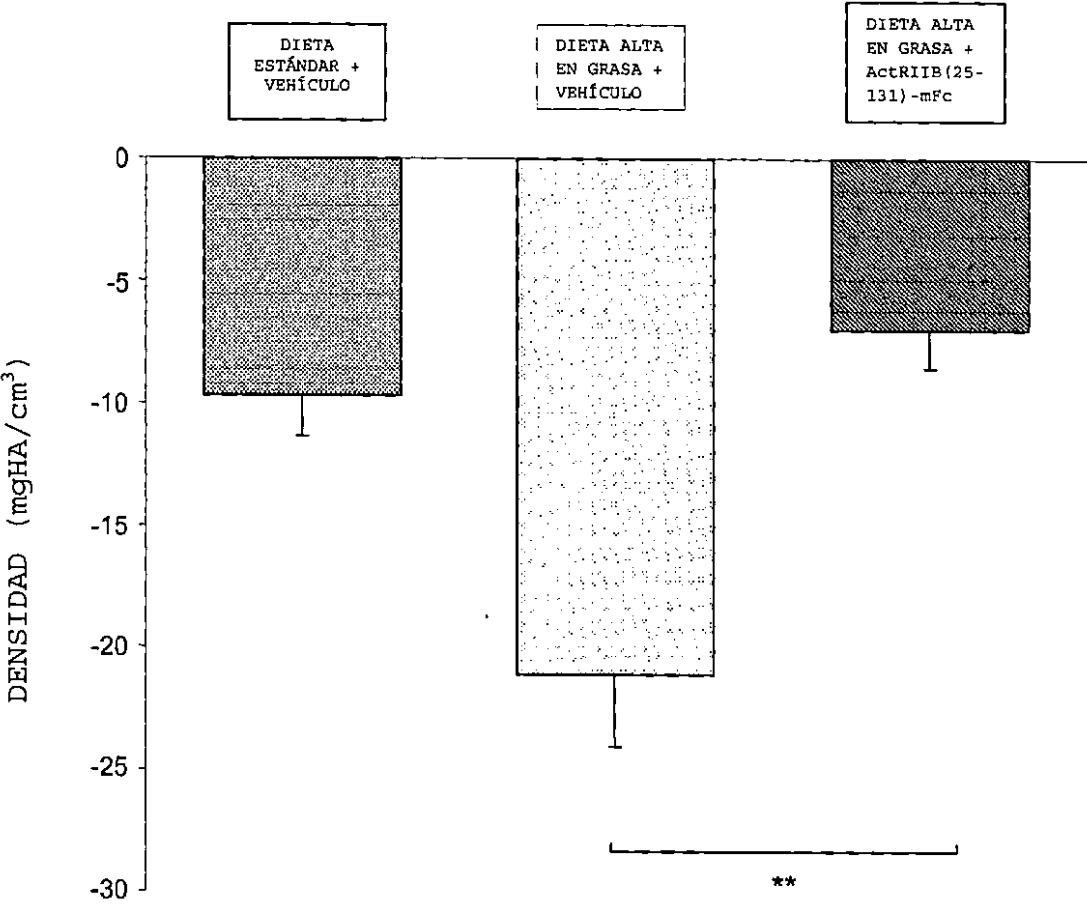


FIGURA 25

110

28/34

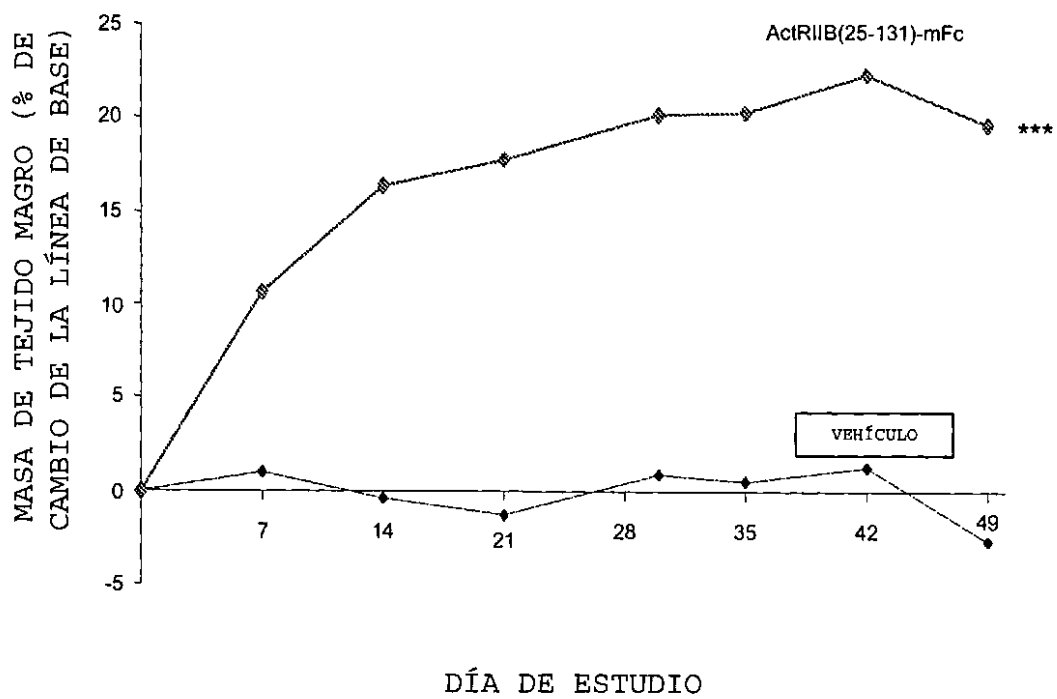


FIGURA 26

29/34

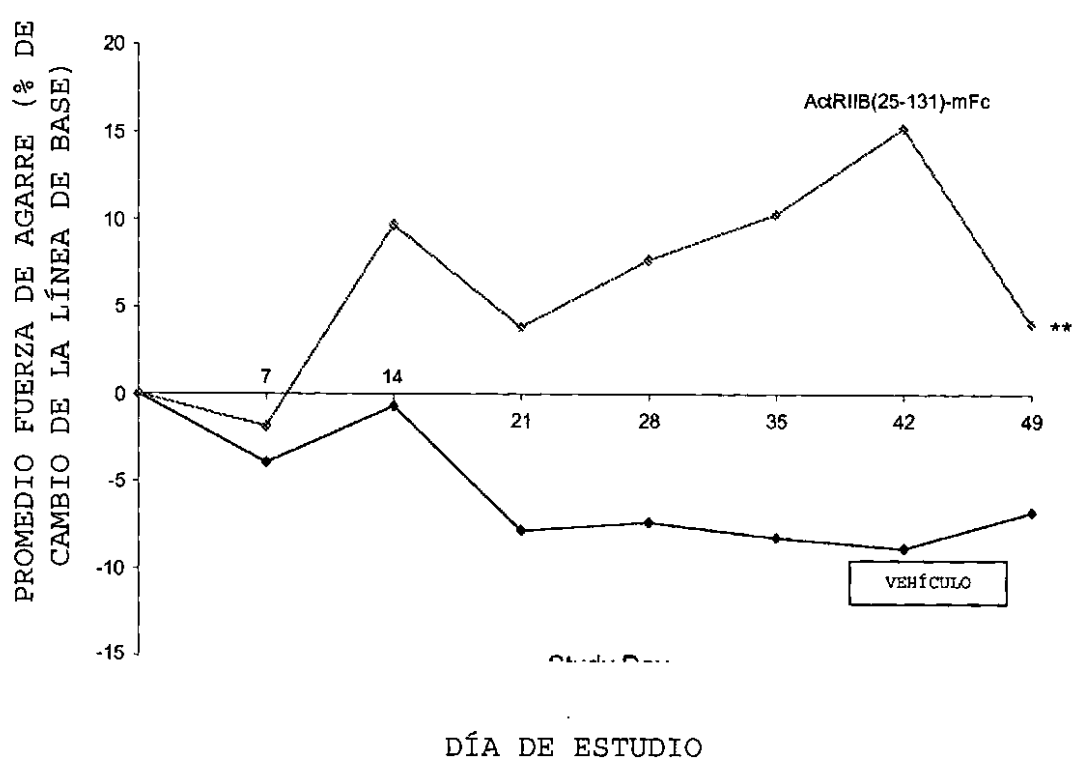


FIGURA 27

112

30/34

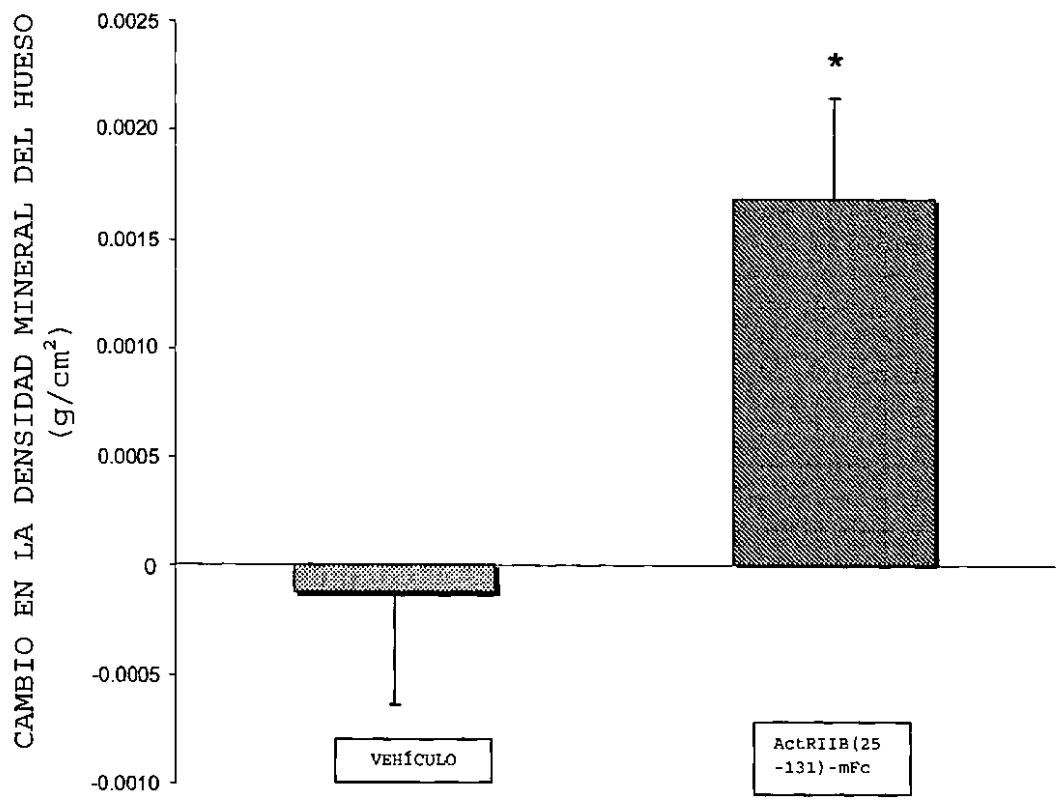


FIGURA 28

113

31/34

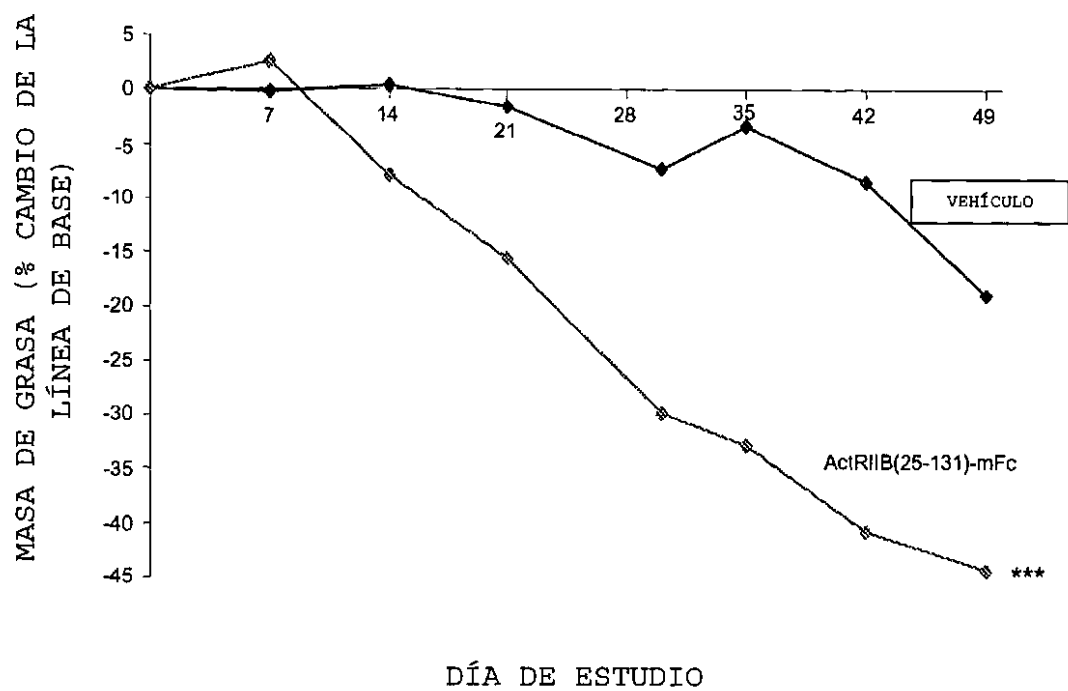


FIGURA 29

114

32/34

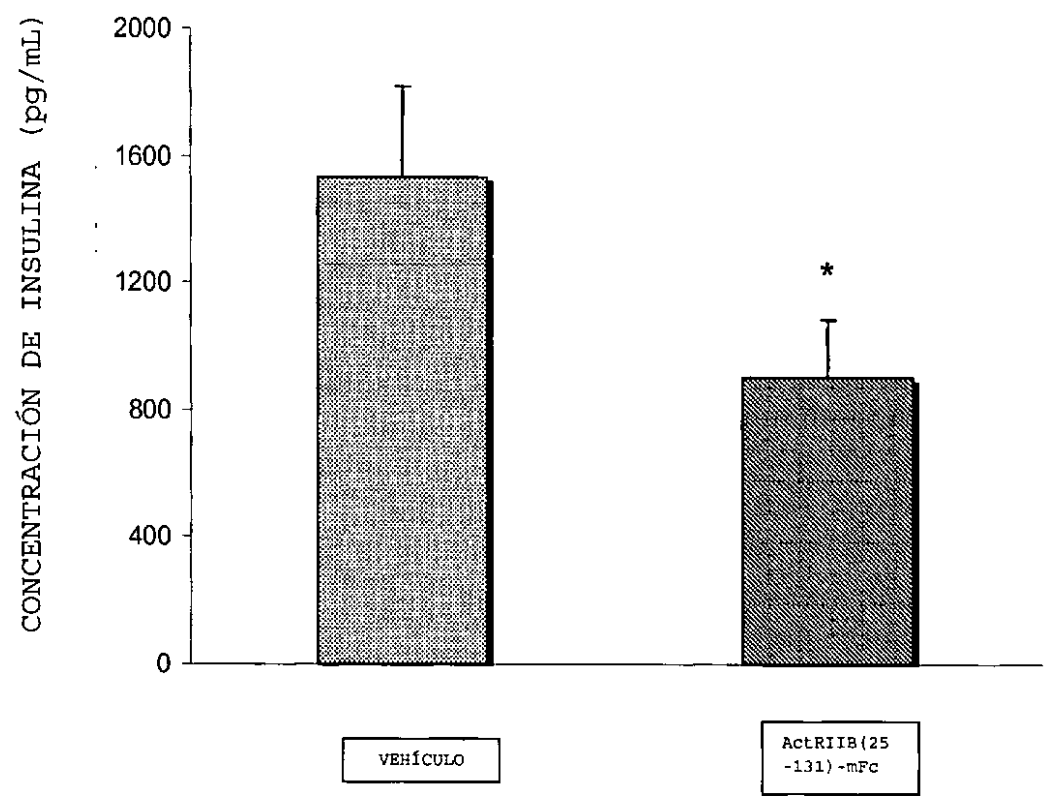


FIGURA 30

115

33/34

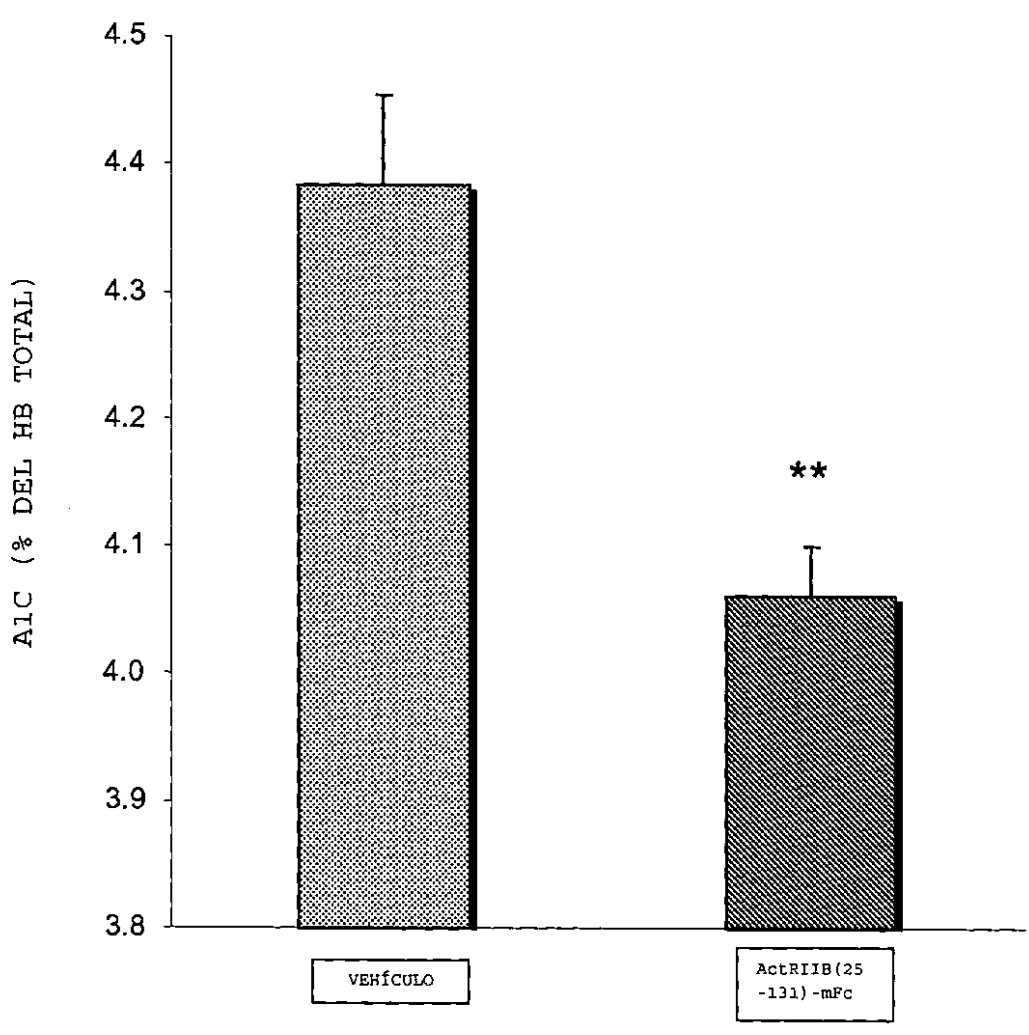


FIGURA 31

34/34

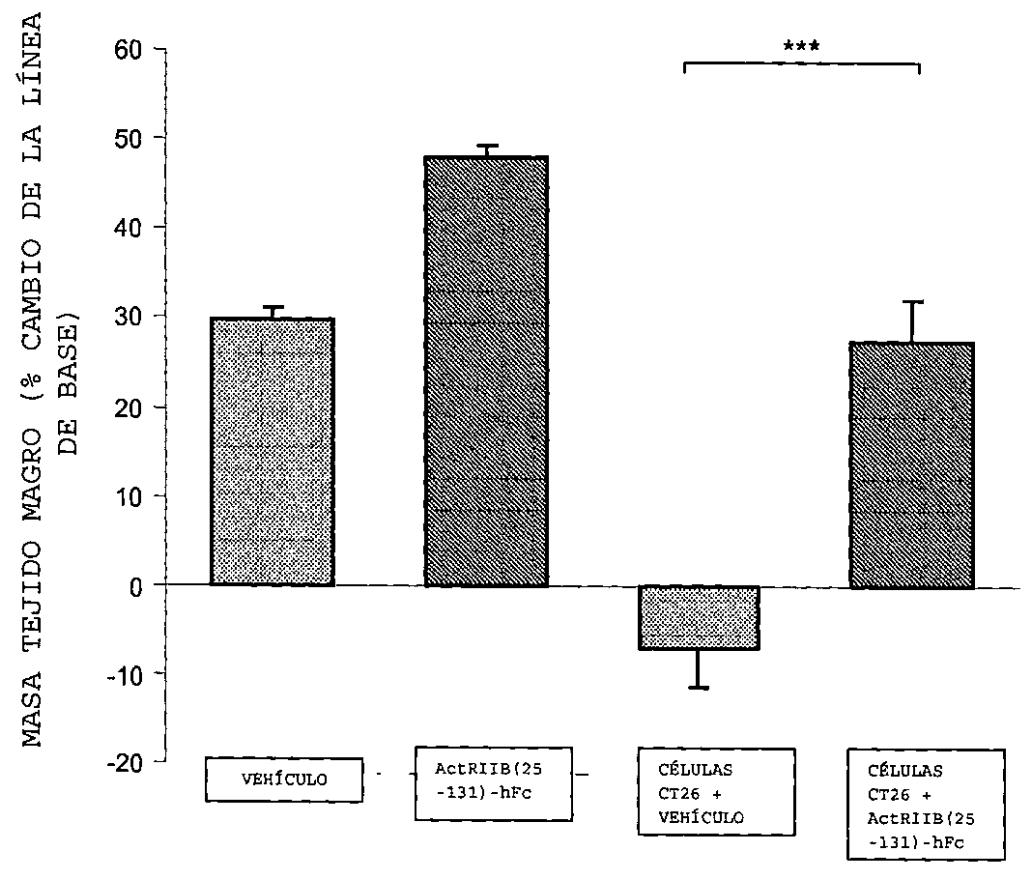


FIGURA 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/037787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (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)

GenomeQuest: Sequence search on nucleic acid sequence SEQ ID NO: 4 & SEQ ID NO: 6 and on amino acid sequence SEQ ID NO: 1 & SEQ ID NO: 8

EPODOC & WPI keywords: ActRIIB, fusion, metabolic and other like terms

Medline, HCAPLUS and BIOSIS keywords: ActRIIB, fusion, metabolic and other like terms

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/109167 A2 (AMGEN INC.) 12 September 2008 Abstract, Pages 4 and 5, Page 12, paragraph 3 to Page 14, paragraph 1, Page 11, paragraph 3, Table 4 and SEQ ID NO's 17, 57 and 60	3-8, 10, 12-39
X	US 2001/0039036 A1 (MATHEWS ET AL.) 8 November 2001 Abstract, Paragraphs [0011] and [0120] and SEQ ID NO: 3	3, 5-8, 10, 12-22, 24, 32
X	WO 2008/151078 A1 (WYETH) 11 December 2008 Abstract, Page 7, paragraph 2 to Page 8, paragraph 1, Page 36, paragraph 2, page 49, paragraph 3, and SEQ ID NO: 17 and 18	1, 3, 5-22, 24, 27-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C
 ☒ See patent family annex

* Special categories of cited documents:	
"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 26 August 2010	Date of mailing of the international search report 31 AUG 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 Esther Ng AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No: +61 2 6283 3129

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/037787

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/020884 A2 (WYETH) 23 February 2006 Abstract, Paragraphs [0008]-[0011], [0051]-[0053], [0055], [0060], [0067]-[0069], [0071], [0085]-[0088], Example 2 and SEQ ID NO: 60 and 61	1, 3-22, 24-39
X	WO 2008/097541 A2 (ACCELERON PHARMA INC.) 14 August 2008 Abstract, Page 2, paragraph 1, Page 7, paragraphs 1 and 3, Figure 2, Claims 85-88, Examples 6-13 and SEQ ID NO's 1-5, 10 and 12	1, 3-39
X	WO 2006/012627 A2 (ACCELERON PHARMA INC.) 2 February 2006 Summary of Invention, Pages 1-7, 17 and 49-54 and Example 1 and SEQ ID NO's 6, 8 and 15	1, 3-39
X	WO 2008/0076437 A2 (ACCELERON PHARMA INC.) 26 June 2008 See Summary of invention, pages 3-7, Page 3, paragraph 2 to Page 4, paragraph 1, Page 6, paragraph 3, Page 21, paragraph 2, Examples 5 and 6 and SEQ ID NO's 18, 19 and 21	1, 3, 4, 5-34
P, X	US 2010/0068215 A1 (SEEHRA ET AL.) 18 March 2010 Paragraphs [0009], [0011], [0092]-[0096], [0148], Example 6 and SEQ ID NO: 4, 5, 12, 25, 26, 27, 30 and 31	1-3, 5-34
E	US 2010/0183624 A1 (SEEHRA ET AL.) 22 July 2010 Abstract, Paragraphs [0005]-[0008], [0011], [0132]-[0135], [0146]-[0147], Examples 3 and 9 and SEQ ID NO: 1-5, 10, 12, 16, 18, 23, 25 and 33-34	1, 3-39
P, X	SAKO D. et al, 'Characterization of the Ligand Binding Functionality of the Extracellular Domain of Activin Receptor Type IIB', The Journal of Biological Chemistry, available online April 2010, Vol. 285, No. 27, pages 21037-21048 Page 21038, left column, paragraph 3 and Figure 1A.	27-32
P, X	CADENA S.M. et al, 'Administration of a Soluble Activin Type IIB Receptor Promotes Skeletal Muscle Growth Independent of Fiber Type', Journal of Applied Physiology, May 2010, pages 1-25 (Ahead of print) Page 6, paragraph 1 and Page 14, paragraph 1	27-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/037787

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 2008109167	AR	065611	AU	2008223338	CA 2679841
	CL	6642008	CN	101679980	CR 11054
	EA	200970810	EP	2132314	KR 20090127146
	MX	2009009495	PE	18042008	US 2009227497
	ZA	200906169			
US 2001039036	AU	19945/92	CA	2086327	EP 0542971
	US	5885794	US	6162896	US 6835544
	US	2005186593	US	2010016558	WO 9220793
WO 2008151078	CA	2685306	EP	2150560	MX 2009012934
	US	2009017019			
WO 2006020884	AU	2005272646	BR	PI0514253	CA 2575563
	CN	101001642	EP	1778275	MX 2007000976
	US	2006034831			
WO 2008097541	AR	065169	AU	2008214375	CA 2677160
	CN	101679505	EA	200970729	EP 2125884
	MX	2009008154	US	2009005308	
WO 2006012627	AU	2005266875	CA	2574777	EP 1771470
	US	2006068468	US	7709605	
WO 2008076437	AU	2007334333	CA	2672758	CN 101687015
	EA	200970603	EC	SP099514	EP 2124999
	KR	20090096517	MX	2009006651	US 2009047281
	US	2009163417	US	2010028331	US 2010204092
	US	2010028332	WO	2009158015	WO 2009158033
US 2010068215	WO	2010019261			
US 2010183624	WO	2010083034			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

SOBRE CON ARTE



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl:	C07K 014/705
22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s)	ACCELERON PHARMA INC.
(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
				(72) Inventor(es)	JASBIR SEEHRA RAVINDRA KUMAR
				(74) Apoderado:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85)	Fecha limite inicio fase nacional:				12/01/2012
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				
	Fecha de presentación de la solicitud:				08/06/2010
	No. de solicitud PCT/US2010/037787				
				(87)	Publicación internacional
				Fecha:	29/12/2010
				N° publicación:	WO 2010/151426 A1
(54) Título: PROTEÍNAS DE FUSIÓN ACTRIIB-FC TRUNCADAS					

22) Fecha de solicitud:

(71)Solicitante(s) **ACCELERON PHARMA INC.**

(30) Prioridad	(31) <i>Prioridad</i>	(32) <i>Fecha</i>	(33) <i>País</i>
	61/268,128	08/06/2009	US
	61/267,422	10/09/2009	US
	61/280.545	03/11/2009	US

61/268,128 08/06/2009 US

61/267,422 10/09/2009 US

61/280,545 03/11/2009 US

(72) Inventor(es) **JASBIR SEEHRA**
RAVINDRA KUMAR

RAVINDRA KUMAR

(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

(85)	Fecha limite inicio fase nacional:	12/01/2012
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	
	Fecha de presentación de la solicitud:	08/06/2010
	No. de solicitud PCT/US2010/037787	

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 08/06/2010
No. de solicitud PCT/US2010/037787

Fecha de presentación de la solicitud: 08/06/2010

No. de solicitud PCT/US2010/037787

(87) Publicación internacional
Fecha: 29/12/2010
Nº publicación: WO 2010/151426 A1

Fecha: 29/12/2010

Nº publicación: **WO 2010/151426 A1**

(54) Título: **PROTEÍNAS DE FUSIÓN ACTRIIB-FC TRUNCADAS**

Resumen:

Bajo ciertos aspectos, el presente invento proporciona compuestos que contienen poli-péptidos que se derivan del ActRIIB para regular (fomentar o inhibir) el crecimiento de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo, grasa, tejido adiposo marrón y/o tejido neuronal y para el tratamiento de desórdenes metabólicos tales como diabetes y obesidad así como desórdenes asociados con cualquiera de los tejidos anteriores.

[illegible]

FIGURA 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 001890

Bogotá D.C., Enero 06 de 2012 - 17:11:42

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	427470923	06/01/2012	22.030.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1612 TASA ANUAL AÑOS 9 a 12 CUATRENIO PARA MANTENIMIENTO DE	465.000.00	465.000.00
				\$465.000.00

=====

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-004167- -00000-0000

Fecha: 2012-01-12 15:18:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

COLO: 19033-841-002-9,

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 6 de 2012 - 17:11:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 126497

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. 12-004167- -00000-0000

Fecha: 2012-01-12 15:18:20

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 132

0010: 39033 - 841-002-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 28 de 2011 - 11:27:10

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

AL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-004167- -00000-0000

Fecha: 2012-01-12 15:18:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

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 ☐