



No. 12-056563- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 11:44:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130TRA. 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 ANTAGONISTAS DE ACTRIIB Y POSOLOGÍA Y

USOS DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE ACCELERON PHARMA INC.

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

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

22. BOGOTÁ, D. C., _____



PE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-056563- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 11:44:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130
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 América.

Dirección: 128 Sidney Street,
Cambridge,
Massachusetts 02139,
Estados Unidos de América

Domicilio: Cambridge,
Massachusetts,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Jasbir SEEHRA**
3 Lincoln Terrace,
Lexington
Massachusetts 02421-6818,
Estados Unidos de América

3. **Ken ATTIE**
228 Marlborough Street
Boston,
Massachusetts 02116
Estados Unidos de América

2. **John KNOFF**
147 Robbins Drive,
Carlisle,
Massachusetts 01741,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/048322

Fecha: 09 de septiembre de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/031901 A1

Fecha: 17 de marzo de 2011

6

Título (54)

ANTAGONISTAS DE ACTRIIB Y POSOLOGÍA Y USOS DE LOS MISMOS

7

Clasificación Internacional (51) A61P 019/008

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

09 de septiembre de 2009

(31) Número de Solicitud

61/276.287

9	Comprobante de pago No.: <u>12-0029291</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0027367</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0029258</u>	Fecha: <u>23 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>20 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>23 de marzo de 2012</u>
---	--	---

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 42 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.260.000.oo.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poder de **ACCELERON PHARMA INC.**

☐

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 2011/031901 A1.

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☒

Arte final 12x12

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

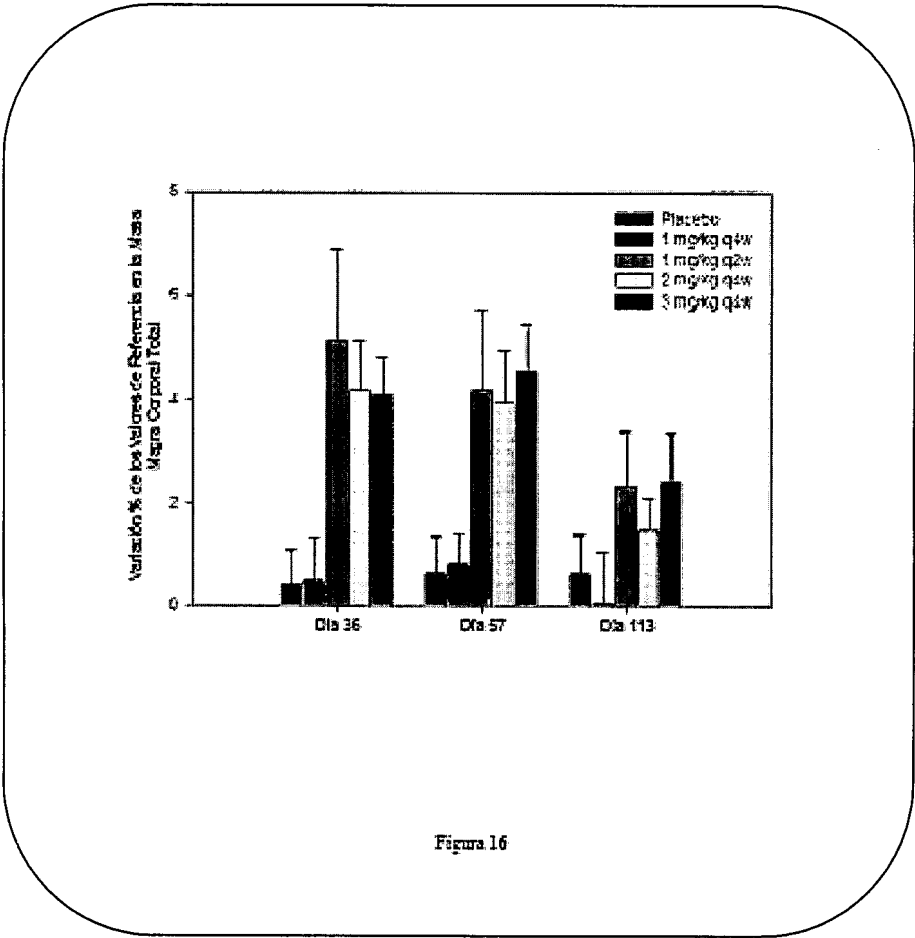


Figura 16

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/031901 A1

Descripción:

Páginas 81 en español

Reivindicaciones: Número (s) 52

Figuras: Número (s) 16

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

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción adjuntado la dirección del inventor **Ken ATTIE.**

4. ☒ Extracto de publicación.

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

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 3

DE LA ESCRITURA NUMERO:
FECHA: 15/Febrero/2012

0595

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS



CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notariasexta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: 0595 - - - - -

- - - CERO QUINIENTOS NOVENTA Y CINCO - - - - -

FECHA: QUINCE (15) DE FEBRERO - - - - -

DEL AÑO DOS MIL DOCE (2012) - - - - -

NOTARIA SEXTA (6ª) DEL CIRCULO NOTARIAL DE

BOGOTA D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER GENERAL

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO

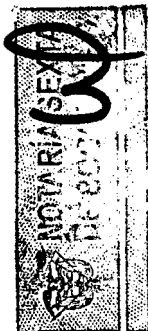
- - - - - Notario(a) Sexto (6º) - - - - - de éste Círculo Notarial,
se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: -

**CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE EL
NOTARIO :** -----

COMPARECIO : Con minuta correo electrónico la señora **ADRIANA ZAPATA
GIRALDO**, mayor de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la
cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: -----

-----**ESTIPULACIONES:** -----

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad
denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la **Carrera 4 No. 72-35,**
Bogotá, Colombia. **SEGUNDA:** Que **ACCELERON PHARMA INC.,** sociedad
constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de
América, domiciliada en 128 Sidney Street Cambridge, Massachusetts, 02139
Estados Unidos de América, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su
representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar
apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación
que se protocoliza. **TERCERA.-** Que en su carácter de representante legal de
CAVELIER ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada po **ACCELERON
PHARMA INC.,** confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ,**
T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344
de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ,** T.P.A. No.73.366, identificada con
cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO
CORREA BARBOSA,** T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de
ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO**



CHARRY, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; el registro de derechos de autor y todo tipo de actos y contratos relacionados con derechos de autor y derechos conexos b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. **CUARTA.-** Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. **QUINTA.-** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día 26 de enero de 2012 por **ACCELERON PHARMA INC.** documento que está debidamente legalizado por Apostilla. -----

Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el



01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

18 DE ENERO DE 2012 HORA 11:44:07

R033513101 PAGINA: 1 de 3

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA).--.

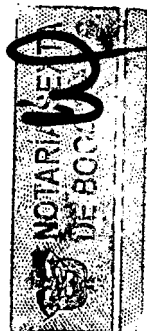
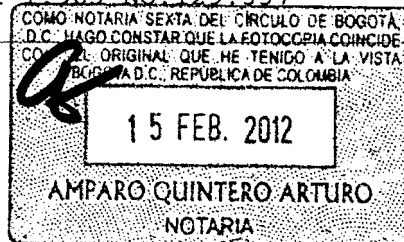
CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO. 129.337



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243
1336	2010/03/16	0006	BOGOTA D.C.	2010/03/24	00012506
915	2011/02/28	0006	BOGOTA D.C.	2011/03/03	00013022

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE SE TIENE A LA VISTA EN LA NOTARIA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

NO. TOTAL DE \$1.00 CADA UNA,

CERTIFICA:
000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR DISTRIBUIDO ASI :

15 FEB. 2012

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

18 DE ENERO DE 2012 HORA 11:44:07

R033513101

PAGINA: 2 de 3

- SOCIO CAPITALISTA (S)

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

NO. CUOTAS: 1,200.00

C.E. 000000000131100

VALOR: \$1,200.00

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

NO. CUOTAS: 8,800.00

N.I.T. 000008001722568

VALOR: \$8,800.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

ZAPATA GIRALDO ADRIANA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000051680061

VALOR: \$0.00

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000035456344

VALOR: \$0.00

SARMIENTO CHARRY EDNA DARMELY

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000052006265

VALOR: \$0.00

TOBON FRANCO NATALIA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000051725514

VALOR: \$0.00

OSORIO LOPEZ NIDIA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000039787682

VALOR: \$0.00

CHAVARRO JORGE

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000016209380

VALOR: \$0.00

CORREA BARBOSA OSCAR FERNANDO

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000079524634

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

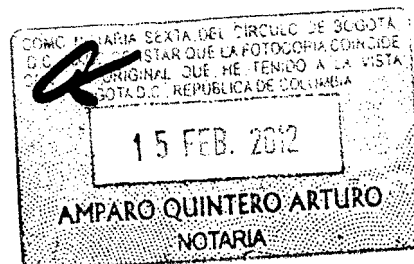
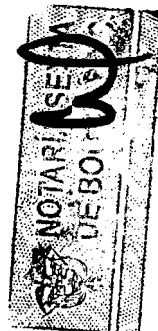
VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES



ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 000000002877924
QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):	

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):	

NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

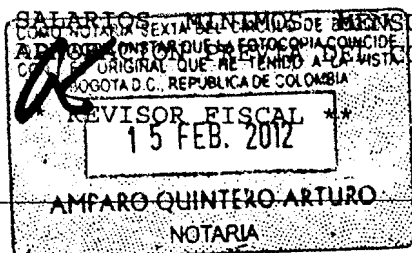
CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:





01

* 1 1 4 1 4 2 7 0 4 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

18 DE ENERO DE 2012 HORA 11:44:07

R033513101

PAGINA: 3 de 3

* * * * *

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

REVISOR NOMBRE
FISCAL

IDENTIFICACION

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

C.C. 000000002877024

QUE POR ACTA NO. 33 DE CONCEJO DEL 25 DE MARZO DE 2011, INSCRITA EL 10 DE MAYO DE 2011 BAJO EL NUMERO 00013098 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL SUPLENTE

PAEZ SANABRIA ALVARO

C.C. 000000019323543

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

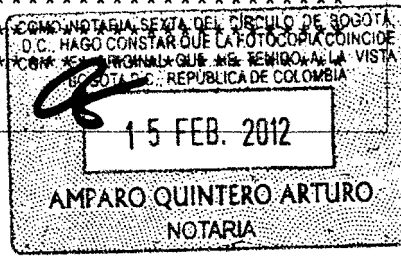
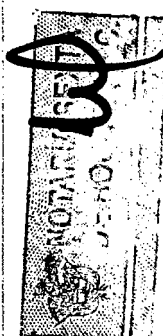
* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *

* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

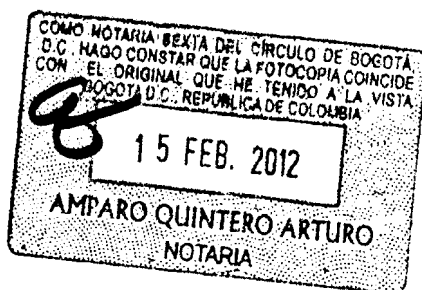
EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

[illegible]

VALOR : \$ 4,000

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA
POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO
DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A
CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q



The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by: Deborah Burke

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: Deborah Burke
whose commission expires on: July 6, 2018

Certified

5. at: Boston, Massachusetts

6. the: 1 February, 2012

7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1578704

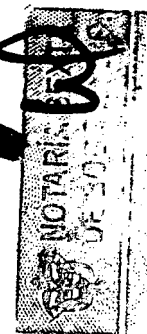
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

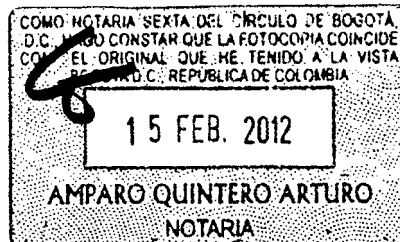
10. Signature:



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



prepared by jphelan



CAVELIER**ABOGADOS**

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4a N° 72-35

BOGOTÁ 9 - COLOMBIA

REPRESENTACION**REPRESENTATION**

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

ACCELERON PHARMA INC.

domiciliado (s)	128 Sidney Street, Cambridge,
en/of	Massachusetts 02139, United States of America

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 90820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales e extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes opositores, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así

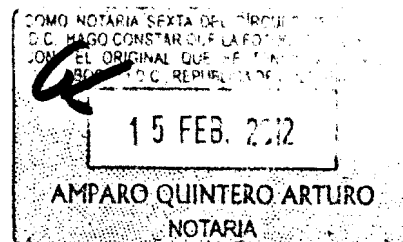
Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367 3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted hereto. Likewise, the

© CAVELIER ABOGADOS

WPC/9033/ID 207384



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____
 es auténtica: que el signatario desempeña actualmente el cargo
 de _____
 de la compañía _____
 sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a
 las leyes de _____
 que la dirección de dicha compañía es _____
 y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los
 documentos respectivos y de todo ello da fe
 Dado y firmado en _____
 El _____

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature
 of John Knopf
 is authentic, that the signatory currently acts in the position of CEO
 of the company Acceleron Pharma
 a company currently existing and organized under the laws of Delaware USA
 that the address is 128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139
USA
 and that the signatory has the power to grant this document

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon
 examination of the corresponding documents
 Given and signed in Cambridge, Massachusetts
 On January 26, 2012

El Notario Público
 (Firma-sello)

The Notary Public
 (Signature-seal)

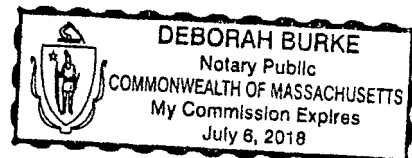
Deborah Burke

APOSTILLE
 (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

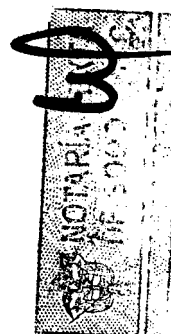
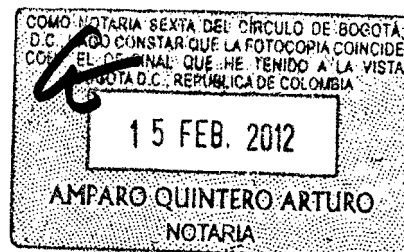
1. Country: _____
This public document
2. has been signed by _____
3. acting in the capacity of _____
4. bears the seal/stamp of _____

Certified

5. at _____ 6. the _____
7. by _____
8. No. _____
9. Seal/stamp _____ 10. Signature _____



© CAVELIER ABOGADOS
 WPC19033/ID 207384



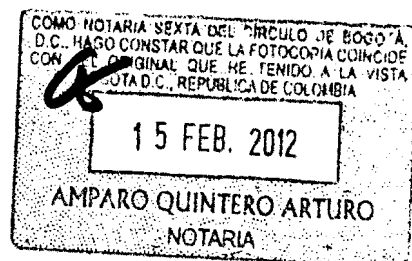
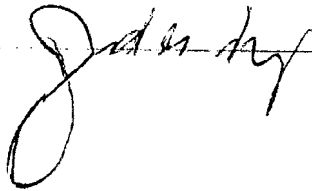
unismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy / Given and signed this January 26, 2012
En/in Cambridge, Massachusetts, USA

Por/by John Knopf
CEO Acceleron Pharma

Firma/Signature X



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de _____

de la compañía _____

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de _____

que la dirección de dicha compañía es _____

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe

Dado y firmado en _____

El _____

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of John Knopf

is authentic, that the signatory currently acts in the position of CEO

of the company Acceleron Pharma

a company currently existing and organized under the laws of Delaware USA

that the address is 128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139
USA

and that the signatory has the power to grant this document

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents

Given and signed in Cambridge, Massachusetts

On January 26, 2012

Deborah Burke

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country _____
This public document

2. has been signed by _____

3. acting in the capacity of _____

4. bears the seal/stamp of _____

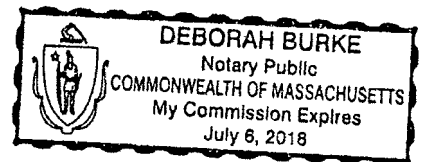
Certified

5. at _____ 6. the _____

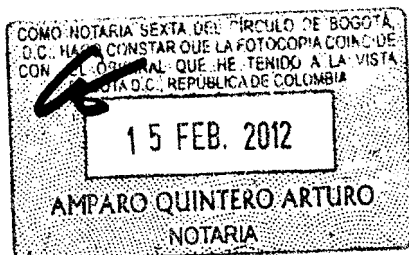
7. by _____

8. No. _____

9. Seal/stamp _____ 10. Signature _____



© CAVELIER ABOGADOS
WPC19033/ID 207384



(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961;

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO:

2. HA SIDO FIRMADO POR DEBORAH BURKE

3. QUIEN ACTUA EN SU CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO

4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DEBORAH BURKE

CUYO NOMBRAMIENTO VENCE EL 6 DE JULIO DE 2018

CERTIFICADO

5. EN BOSTON, MASSACHUSETTS

6. EL 1° DE FEBRERO DE 2012

7. POR EL SECRETARIO DEL ESTADO

8. NÚMERO 1578704

9. SELLO/ESTAMPILLA: GRAN SELLO DEL ESTADO

10. FIRMA: WILLIAM FRANCIS GALVIN, SECRETARIO DEL ESTADO

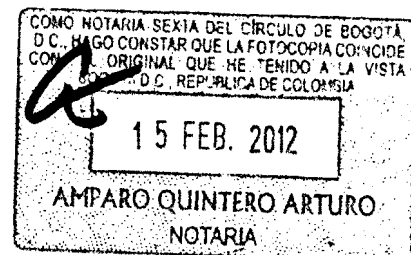
COLO-19033-841-002-9

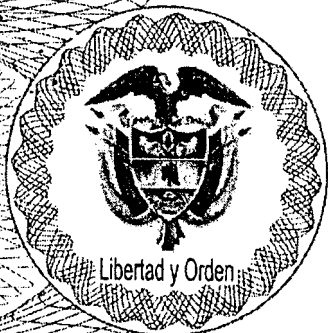
300 palabras. 1 hora.

ECN\ECN\ID-210305\WPC19033

Bogotá, 8 de febrero de 2012.

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
INGLES - ESPAÑOL - RUSO
Res. 541 febrero de 1977





REPÚBLICA DE COLOMBIA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
LEGALIZACION

País: REPUBLICA DE COLOMBIA
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: CALADO NOGUERA EDUARDO
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: TRADUCTOR OFICIAL
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: BOGOTA D.C
(At: - À:)

El: 2/9/2012 12:27:58 p.m.
(On: - Le:)

Por: APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: LMCJ122758388
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: 1578704
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: TRADUCCION APOSTILLA
(Type of document: - Type du document:)

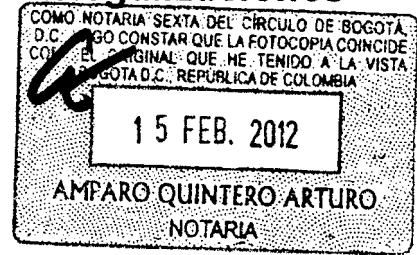
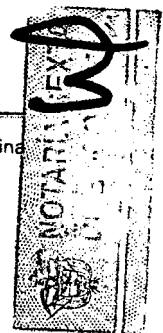
Número de hojas: 2
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100117995301123

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'authenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones





contenido de esta escritura pública. _____

hasta aqui la minuta

NOTA: se advirtió a los otorgantes de esta escritura de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar,

modificar o corregir lo pertinente antes de firmarlo, la firma de la misma demuestra su aprobación total; en consecuencia, el notario no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de él(la,las,los) otorgante(s) y del notario. en tal caso, éste(a,as,os) debe(n) ser corregido(s) mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y/o por el titular del derecho según el caso, y sufragados los gastos por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1.970). -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION : Leída la presente escritura pública por la Compareciente y habiéndosele hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartió su aprobación y en constancia la firma por ante mí el Notario que AUTORIZA. -----

DERECHOS NOTARIALES : RESOLUCION 11439 del 29 de diciembre año 2011, \$ 45.320 ----- IVA : \$ 17.937 -----

RECAUDO SUPERINTENDENCIA : \$ 4.250 -----

RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO : \$ 4.250 -----

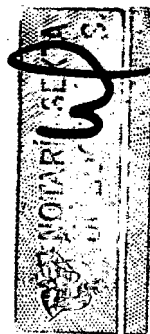
PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió en las hojas de papel sellado números : 7-700181 413202, 7-700181 413219.

EN BLANCO... EN BLANCO

ADRIANA ZAPATA GIRALDO

CC.# 516800061 RZ

Representante Legal **CAVELIER ABOGADOS**





AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIO SEXTO (6º) DE BOGOTA D.C.

Digitó	Mile Atuesta/ año 2012/ PODER ACELERON
Revisó	<i>[Signature]</i>
Identificó	
Cerro	<i>[Signature]</i>



ES FIEL Y TERCERA COPIA (FOTOCOPIA), TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 0595 DE FECHA 15 DE FEBRERO DE 2012.

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 10 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. MARZO 15 DE 2012

RESOLUCION 01 DE 2008

POR LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



MABEL ANDREA RODRIGUEZ DIAZ.
NOTARIA SEXTA (E). DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/031901 A1

(51) International Patent Classification:

A61P 19/08 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

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

(21) International Application Number:

PCT/US2010/048322

(22) International Filing Date:

9 September 2010 (09.09.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/276,287 9 September 2009 (09.09.2009) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SEEHRA, Jasbir [US/US]; 3 Lincoln Terrace, Lexington, MA 02421-6818 (US). KNOPE, John [US/US]; 147 Robbins Drive, Carlisle, MA 01741 (US). ATTIE, Ken [-/US].

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

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

[Continued on next page]

(54) Title: ACTRIIB ANTAGONISTS AND DOSING AND USES THEREOF

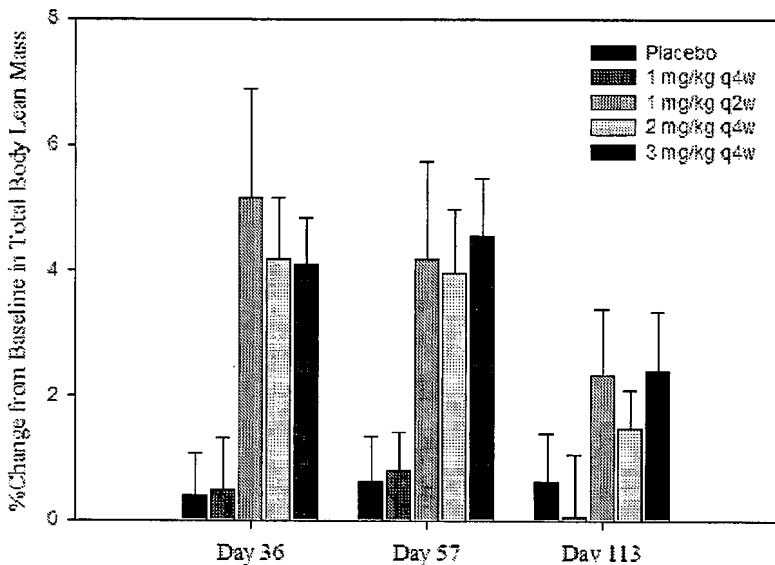


Figure 16

(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for promoting bone growth and increasing bone density, as well as for the treatment of multiple myeloma. Methods for dosing a patient with an ActRIIB antagonist are also provided.

WO 2011/031901 A1

17 #

WO 2011/031901 A1

Published:

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

ANTAGONISTAS DE ACTRIIB Y POSOLOGÍA Y USOS DE LOS MISMOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/276,287, presentada el 9 de septiembre de 2009, cuyas enseñanzas se incorporan por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los trastornos del hueso, que van desde osteoporosis a fracturas, representan un conjunto de estados patológicos para los cuales existen pocos agentes farmacéuticos. En su lugar, el tratamiento se focaliza en intervenciones físicas y conductuales, incluyendo inmovilización, ejercicio y cambios en la dieta. Sería conveniente contar con agentes terapéuticos que promuevan el crecimiento ósea y aumenten la densidad ósea, con el propósito de tratar una variedad de trastornos óseos.

El crecimiento y la mineralización óseos dependen de las actividades de dos tipos de células, los osteoclastos y los osteoblastos, aunque los condrocitos y las células de la vasculatura participan igualmente en aspectos críticos de estos procesos. Desde el punto de vista del desarrollo, la formación de los huesos ocurre mediante dos mecanismos, osificación endocondrial y osificación intramembranosa, con la primera responsable de la formación de los huesos longitudinales y la última responsable de la formación de huesos topológicamente planos, tales como los huesos del cráneo. La osificación endocondrial requiere la formación y degradación secuenciales de estructuras cartilaginosas en las placas epifisarias, que sirven como moldes para la formación de osteoblastos, osteoclastos, la vasculatura y la mineralización subsiguiente. Durante la osificación intramembranosa, el hueso se forma directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y la subsiguiente deposición de la matriz osteoide.

Las fracturas y otras alteraciones estructurales del hueso cicatrizan mediante un proceso que, por lo menos superficialmente, semeja la secuencia de episodios de desarrollo de osteogénesis, incluyendo la formación de tejido cartilaginoso y la mineralización subsiguiente. El proceso de cicatrización de

fracturas puede ocurrir en dos formas. La cicatrización ósea directa o primaria ocurre sin formación de callo. La cicatrización ósea indirecta o secundaria ocurre con una fase precursora de callo. La cicatrización primaria de fracturas involucra la reformación de la continuidad mecánica a través de una alteración íntimamente establecida. Bajo condiciones apropiadas, células de resorción de hueso que rodean la alteración muestran una respuesta de resorción canalizadora y establecen vías para la penetración de vasos sanguíneos y la cicatrización subsiguiente. La cicatrización secundaria de los huesos sigue un proceso de inflamación, formación de callo blando, mineralización del callo y remodelación del callo. En la fase de inflamación, la formación de hematomas y hemorragia resulta de la alteración de vasos sanguíneos periosteales y endosteales en el sitio de la lesión. Células inflamatorias invaden el área. En la fase de formación de callo blando, las células producen nuevos vasos, fibroblastos, material intracelular y células de soporte, que forman tejido de granulación en el espacio entre los fragmentos de la fractura. La unión clínica a través de la alteración se establece por tejido fibroso o cartilaginoso (callo blando). Se forman osteoblastos y median la mineralización de callo blando, el cual se reemplaza entonces por hueso laminar y se somete al proceso normal de remodelación.

Además de las fracturas y otras alteraciones físicas de la estructura ósea, la pérdida de contenido mineral óseo y masa ósea pueden causarse por una amplia variedad de afecciones y pueden tener como resultado problemas médicos significativos. Los cambios en la masa ósea ocurren en una forma relativamente predecible durante la vida del individuo. Hasta la edad de 30 años, los huesos tanto de hombres como mujeres crecen a una masa máxima mediante crecimiento lineal de las placas epifisarias endocondriales y radiales. Pasada aproximadamente la edad de los 30 años (para el hueso trabecular, v.g., huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y la edad de los 40 años (para el hueso cortical, v.g., huesos largos hallados en las extremidades), ocurre una lenta pérdida ósea tanto en hombres como mujeres. En las mujeres, ocurre igualmente una fase final de pérdida ósea sustancial, probablemente debida a deficiencias de estrógeno pos-menopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y 25% del compartimiento trabecular. Si la pérdida ósea progresiva resulta en un estado patológico tal como osteoporosis depende en gran medida de la masa ósea inicial del individuo y de si hay estados agravantes.

20 29

La pérdida ósea se caracteriza a veces como un desequilibrio en el proceso normal de la remodelación ósea. El hueso sano está sometido constantemente a remodelación. La remodelación comienza con la resorción de hueso por los osteoclastos. El hueso resorbido se reemplaza entonces por nuevo tejido óseo, el cual se caracteriza por la formación de colágeno mediante osteoblastos y la calcificación subsiguiente. En individuos sanos los índices de resorción y formación están balanceados. La osteoporosis es una afección progresiva crónica, marcada por un cambio hacia la resorción, que resulta en una disminución general en la masa ósea y la mineralización ósea. La osteoporosis en humanos está precedida por osteopenia clínica (densidad mineral ósea que es mayor que una desviación estándar, pero menor que 2.5 desviaciones estándar por debajo del valor de la media para un hueso adulto joven). A nivel mundial, aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de osteoporosis.

Por consiguiente, métodos para controlar el balance entre actividad de los osteoclastos y los osteoblastos pueden ser útiles para promover la cicatrización de fracturas y otro daño al hueso, así como el tratamiento de trastornos, tales como osteoporosis, asociados con la pérdida de masa ósea y mineralización ósea.

Con respecto a la osteoporosis, estrógeno, calcitonina, osteocalcina con vitamina K, o altas dosis de calcio dietario se usan todos como intervenciones terapéuticas. Otros tratamientos para la osteoporosis incluyen bifosfonatos, hormona paratiroide, calcimiméticos, estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio, y fluoruro de sodio. Tales fármacos sin embargo, se asocian a menudo con efectos secundarios indeseados.

En consecuencia, es un objeto de la presente divulgación proporcionar composiciones y métodos para promover el crecimiento y la mineralización óseos.

RESUMEN DE LA INVENCION

En parte, la divulgación demuestra que los antagonistas ActRIIb, incluyendo moléculas a base de ActRIIb (v.g., moléculas que contienen una porción de unión de ligando de un dominio extracelular ActRIIb o una variante del mismo, tales como un ActRIIb-Fc) y otros antagonistas de la señalización ActRIIb, pueden usarse para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento óseo y/o aumentar la resistencia ósea. En particular, la divulgación demuestra que una

forma soluble de ActRIIb promueve una densidad ósea cada vez mayor, crecimiento óseo y resistencia ósea *in vivo*. Mientras que la mayoría de los agentes farmacéuticos, que promueven el crecimiento óseo o inhiben la pérdida ósea, actúan como agentes anti-catabólicos (igualmente denominados por lo común como "agentes catabólicos" (v.g., bifosfonatos) o agentes anabólicos (v.g., hormona paratiroidea, PTH, cuando se medican apropiadamente), la proteína ActRIIb soluble exhibe una doble actividad, teniendo efectos tanto anti-catabólicos como anabólicos. Por consiguiente, los antagonistas ActRIIb pueden usarse para aumentar la densidad ósea y promover el crecimiento óseo. Anticuerpos anti-ActRIIb y moléculas pequeñas direccionadas a ActRIIb y aptámeros, y ácidos nucleicos que disminuyen la expresión de ActRIIb pueden usarse asimismo para tratar trastornos asociados con una densidad ósea baja o una resistencia ósea baja, tales como osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes con necesidad de ello, tales como en pacientes que tienen fractura de hueso (tales moléculas se incluyen igualmente en el término "antagonistas ActRIIb", tal como se emplea en esta especificación). La divulgación indica además que los antagonistas ActRIIb son efectivos en prevenir y/o reparar el daño óseo causado por tumores de mieloma múltiple y metástasis al hueso (v.g., en cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer de colon, cáncer de próstata o cáncer de pulmón) y, adicionalmente, que los antagonistas ActRIIb disminuyen la carga del tumor en mieloma múltiple.

Los antagonistas ActRIIb pueden emplearse además para el tratamiento de una variedad de trastornos o enfermedades, en particular, trastornos musculares y neuromusculares (v.g., distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ALS – *amyotrophic lateral sclerosis*) y atrofia muscular), trastornos del tejido adiposo (v.g., obesidad), trastornos metabólicos (v.g., diabetes tipo 2), trastornos neurodegenerativos y atrofia muscular progresiva, asociada con la edad avanzada (sarcopenia), terapia del cáncer de próstata, y caquexia por cáncer. En modalidades específicas, los antagonistas ActRIIb (v.g., polipéptidos ActRIIb solubles) pueden antagonizar un receptor ActRIIb en cualquier proceso asociado con actividad ActRIIb. Opcionalmente, los antagonistas ActRIIb de la invención pueden diseñarse para antagonizar preferencialmente uno o más ligandos de receptores ActRIIb, tales como GDF8 (también llamado miostatina), GDF11, activina A, Activina B, activina AB, Nodal y BMP7 (también denominada OP-1) y, en consecuencia, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos adicionales. Ejemplos de antagonistas ActRIIb incluyen los polipéptidos ActRIIb de ocurrencia natural, así como variantes funcionales de los

mismos.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos que contienen un polipéptido ActRIIb soluble. Los polipéptidos ActRIIb pueden formularse como un preparado farmacéutico que contiene el polipéptido ActRIIb y un portador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIb se une a activina con una K_D menor que 1 micromolar o menor que 100, 10 o 1 nanomolar. Preferiblemente la composición es por lo menos 95% pura, con respecto a otros componentes del polipéptido, como se evalúa por cromatografía por exclusión de tamaño y, más preferiblemente, la composición es por lo menos 98% pura. Un polipéptido ActRIIb para uso en tal preparado puede ser cualquiera de los divulgados en esta especificación, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos: 2, 3, 13, 17, o 20, o que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos: 2, 3, 13, 17, o 20. Un polipéptido ActRIIb puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIb natural, tal como uno que comprenda por lo menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID Nos: 1-3 o una secuencia de SEQ ID NO: 2, que carezca de 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola"). Un polipéptido ActRIIb puede codificarse por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones restrictivas al ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 o 5.

Un polipéptido ActRIIb puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (v.g., en el dominio de unión de ligando) en relación con un polipéptido ActRIIb de ocurrencia natural. Ejemplos de polipéptidos ActRIIb alterados se proveen en WO 2006/012627, páginas 59-60, incorporada por referencia en esta especificación. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, insecto u otra célula eucariota, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIb de ocurrencia natural.

Un polipéptido ActRIIb puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIb (v.g., una porción de unión de ligando de un ActRIIb o variante del mismo) y uno o más dominios adicionales que confieren una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, direccionamiento a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in*

vivo, absorción/administración, localización o distribución de tejido, formación de complejos de proteína, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. La dimerización o multimerización pueden proporcionar una creciente afinidad de unión de ligando. Una proteína de fusión ActRIIb puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (silvestre o mutante) o una albúmina sérica u otra porción del polipéptido que otorgue propiedades deseadas tales como farmacocinética mejorada, solubilidad mejorada o estabilidad mejorada. Típicamente, una proteína de fusión ActRIIb-Fc se producirá como un complejo hemodimérico. Opcionalmente, una proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende un conector relativamente no estructurado, posicionado entre el dominio Fc y el dominio ActRIIb extracelular. Este conector no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de más o menos 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIb (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de una longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos, que están relativamente libres de una estructura secundaria, o una mezcla de ambas. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una sola secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias repetitivas de treonina/serina y glicinas (v.g., singletes TG₃, TG₄, SG₃ o SG₄ o repeticiones). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una marca de epítipo, una marca FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIb soluble incluye uno o más residuos de aminoácido modificado, seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una fracción de lípido y un aminoácido conjugado a un agente orgánico de derivación. Un preparado farmacéutico puede incluir igualmente uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se emplea para tratar un desorden óseo. Preferiblemente, un preparado farmacéutico es sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una proteína ActRIIb se exprese en una línea celular de mamífero, que media apropiadamente la glicosilación natural de la proteína ActRIIb, de manera que disminuya la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Líneas celulares humanas y CHO se han utilizado exitosamente, y se espera que sean útiles otros sistemas de expresión comunes de mamífero.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRIIb. Un polinucleótido aislado puede comprender una

secuencia codificante para un polipéptido ActRIIb, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (v.g., dominio de unión de ligando) de un ActRIIb y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático, o posicionada entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplasmático. Por ejemplo un polinucleótido aislado puede contener una secuencia del polinucleótido ActRIIb de longitud completa, tal como SEQ ID NO: 4 o 5, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo el citado polinucleótido aislado además un codón de terminación de transcripción por lo menos seiscientos nucleótidos antes del término 3' o posicionado en alguna otra forma, de manera que la traducción del polinucleótido dé origen a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una porción truncada de un ActRIIb de longitud completa. Una secuencia de ácido nucleico preferida es SEQ ID NO: 18. Los ácidos nucleicos divulgados en esta especificación pueden conectarse opcionalmente a un promotor para expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos para elaborar un polipéptido ActRIIb. Tal método puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (v.g., SEQ ID NO. 4, 5 o 18) divulgados en esta especificación en una célula apropiada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO – *Chinese hamster ovary*). Tal método puede incluir: a) cultivar una células bajo condiciones apropiadas para expresión del polipéptido ActRIIb, en donde la citada célula se transforma con un constructo de expresión ActRIIb; y b) recuperar el polipéptido ActRIIb así expresado. Los polipéptidos ActRIIb pueden recuperarse como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación puede llevarse a cabo por una serie de pasos de purificación, incluyendo, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (v.g., Q sefarosa), cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico.

En ciertos aspectos, un antagonista ActRIIb divulgado en esta especificación, tal como un polipéptido ActRIIb, puede usarse en un método para promover el crecimiento óseo o aumentar la densidad ósea en un sujeto. En ciertas modalidades, la divulgación ofrece métodos para tratar un desorden

asociado con una baja densidad ósea, o para promover el crecimiento óseo, en pacientes con necesidad de ello. Un método puede incluir administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad efectiva de antagonista ActRIIb. En ciertos aspectos, la divulgación proporciona usos de un antagonista ActRIIb para elaborar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección, como se describen en esta especificación.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para identificar un agente que estimula el crecimiento, o la mineralización creciente del hueso. El método incluye: a) identificar un agente de prueba que se une a un dominio de unión de ligando de un polipéptido ActRIIb; y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento o mineralización del hueso.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos para medicar a un paciente con una proteína de fusión ActRIIb-Fc, método que incluye administrar una proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente en una pauta posológica que mantiene una concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc de por lo menos 8 µg/mL.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un compuesto para uso en medicar a un paciente con una proteína de fusión ActRIIb-Fc, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc se dosifica en una pauta posológica que mantiene una concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc de por lo menos 8 µg/mL. Otros compuestos ejemplares, usos y regímenes de dosificación se describen en esta especificación y en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de la patente o solicitud contiene por lo menos un dibujo ejecutado en colores. Copias de la publicación de esta patente o solicitud de patente con dibujo(s) en colores se proporcionarán por la Oficina previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

Figura 1 muestra una alineación de secuencias múltiples de varias proteínas ActRIIb de vertebrados y ActRIIA humana.

Figura 2 muestra un perfil farmacocinético (PK) en pacientes humanos para una dosis única de ActRIIb-Fc administrada subcutáneamente.

Figura 3 muestra la variación porcentual media en masa corporal magra 15, 29 o 57 días después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 4 muestra el porcentaje de sujetos con un aumento ≥ 0.5 kg (panel superior) o ≥ 1.0 kg (panel inferior) en masa corporal magra 15, 29 o 57 días después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 5 muestra la variación en leptina, un biomarcador sérico del metabolismo de la grasa, en varios puntos de tiempo después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 6 muestra la variación en adiponectina, un biomarcador sérico del metabolismo de la grasa, en varios puntos de tiempo después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 7 muestra la variación porcentual media en fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP - *bone-specific alkaline phosphatase*), un biomarcador sérico de formación ósea, en varios puntos de tiempo después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 8 muestra la variación porcentual media en telopéptido de colágeno tipo 1 C-terminal (CTX - *C-terminal type 1 collagen telopeptide*), un biomarcador sérico de resorción ósea, en varios puntos de tiempo después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 9 muestra la variación porcentual media en la hormona estimuladora de folículo en el suero (FSH - *follicle-stimulating hormone*) en varios puntos de tiempo después de la administración subcutánea a pacientes humanos de una

dosis única de ActRIIb-Fc.

Figura 10 muestra una imagen de resonancia magnética (MRI - *magnetic resonance imaging*) de un corte transversal de un muslo en un sujeto humano representativo, medicado con una administración subcutánea única de 3 mg/kg de ActRIIb-Fc. El panel superior muestra una evaluación MRI de un muslo, el panel central muestra valores de referencia el día 9, el panel inferior muestra los resultados el día 29 después de la medicación. El músculo se muestra en gris, la grasa subcutánea es rosada, y la grasa intramuscular es verde.

Figura 11 muestra la variación porcentual media de los valores de referencia en el volumen muscular del muslo el día 29 para sujetos humanos medicados con una administración subcutánea única de 1 mg/kg ActRIIb-Fc o 3 mg/kg ActRIIb-Fc, comparada con placebo.

Figura 12 muestra una alineación de la secuencia señal y el dominio extracelular de ActRIIb de SEQ ID NO: 1 (residuos 1-134 de SEQ IDNO: 1) con el dominio extracelular de ActRIIb representado por SEQ ID NO: 2. Tal como se muestra, la secuencia señal tiene 19 aminoácidos de longitud. Por consiguiente, un aminoácido en posición X en SEQ ID NO: 1 tiene la posición correspondiente en X-19 en SEQ ID NO: 2. Para ilustración, la posición 30 de aminoácido en SEQ ID NO: 1 es la posición 11 de aminoácido en SEQ ID NO: 2. Una correlación similar puede determinarse para otras secuencias ActRIIb descritas en esta especificación.

Figura 13 muestra un alineamiento de ActRIIa humano y ActRIIb. Los residuos encerrados en cuadros representan residuos de aminoácido que se considera que contactan directamente un ligando (es decir, la cavidad de unión de ligando) basado en análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas ActRIIb y ActRIIa.

Figura 14 muestra el perfil farmacocinético de ActRIIb-hFc en el suero varios días durante el estudio múltiple de dosis ascendente descrito en Ejemplo 5.

Figura 15 muestra concentraciones séricas de ActRIIb-hFc en el eje superior y la variación porcentual en la hormona estimuladora de folículo (FSH) en el eje inferior.

28/30

Figura 16 muestra la variación porcentual en la masa corporal total, producida por dosis variables de ActRIIb-hFc, medida por DXA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Vistazo General

La superfamilia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencias comunes y motivos estructurales. Estas proteínas son conocidas por ejercer efectos biológicos en una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia desempeñan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. Manipulando la actividad de un miembro de la familia TGF- β , a menudo es posible ocasionar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, los cruces de ganado Piedmontese y Belgian Blue portan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que ocasiona un marcado aumento en masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en humanos, alelos inactivos de GDF8 se asocian con una masa muscular incrementada y, tal como se ha informado, resistencia excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Las activinas son factores de crecimiento de polipéptido dimérico que pertenecen a la superfamilia TGF- β . Existen tres formas principales de activina (A, B, y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, y $\beta_A\beta_B$). El genoma humano codifica asimismo una activina C y una activina E, las cuales se expresan principalmente en el hígado. En la superfamilia TGF- β , las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir positiva o negativamente en la evolución del ciclo celular dependiendo del tipo de célula, e inducir la diferenciación mesodérmica por lo menos en embriones anfibios (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997,

Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Más aún, se descubrió que el factor de diferenciación eritroide (EDF - *erythroid differentiation factor*) aislado de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A actúa como un regulador positivo, natural, de eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de la activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimuladora de folículo (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP - *follistatin-related protein*), y α_2 -macroglobulina.

Las señales de la familia TGF- β están medidas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa tipo I y tipo II, los cuales fosforilan y activan corriente abajo proteínas Smad, luego de la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión de ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático con especificidad serina/treonina predicha. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores tipo II se requieren para unir ligandos y para expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina tipo I y tipo II forman un complejo estable luego de la unión de ligando, resultando en fosforilación de receptores tipo I por receptores tipo II.

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

30/11

Como se demuestra en esta especificación, un polipéptido ActRIIb (ActRIIb[20-134]-Fc) es efectivo para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea *in vivo*, incrementando también al mismo tiempo la masa muscular. Sin querer limitarse a un mecanismo particular, se espera que el efecto de ActRIIb sobre el hueso se produzca principalmente por un efecto de un antagonista de activina. Independientemente del mecanismo, es evidente a partir de los datos presentados en esta especificación que los antagonistas ActRIIb aumentan la densidad ósea y afectan los biomarcadores óseos en una manera que es consistente con un efecto anabólico/anti-resortivo combinado en humanos. Debe observarse que el hueso es un tejido dinámico, con crecimiento o encogimiento y una densidad creciente o decreciente dependiendo de un equilibrio de factores que producen hueso y estimulan la mineralización (principalmente osteoblastos) y factores que destruyen y desmineralizan el hueso (principalmente osteoclastos). El crecimiento y la mineralización óseos pueden incrementarse favoreciendo los factores productivos, disminuyendo los factores destructivos, o ambos. Los términos "promover el crecimiento óseo" y "aumentar la mineralización ósea" se refieren a los cambios físicos observables en el hueso y pretenden ser neutros en cuanto al mecanismo mediante el cual ocurren cambios en el hueso.

Además de promover el crecimiento óseo, la divulgación contempla usar antagonistas ActRIIb en tratar o prevenir enfermedades o afecciones que se asocian con actividad anormal de un ActRIIb o un ligando ActRIIb. Por ejemplo, los antagonistas ActRIIb pueden utilizarse para tratar trastornos o enfermedades humanos o animales. Ejemplos de tales trastornos o enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos metabólicos tales como diabetes tipo 2, tolerancia anormal a la glucosa, síndrome metabólico (v.g., síndrome X), y resistencia a la insulina inducida por trauma (v.g., quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos de tejido adiposo (v.g., obesidad); trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ALS - *amyotrophic lateral sclerosis*); atrofia muscular; atrofia de órganos; endeblez; síndrome del túnel carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de consunción muscular. Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en las personas de edad avanzada y/o mujeres posmenopáusicas; osteoporosis inducida por glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; y fracturas relacionadas con osteoporosis. Ejemplos adicionales incluyen masa ósea baja debido a terapia crónica con glucocorticoides, deficiencia gonadal prematura,

31/28

supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa.

Esta divulgación proporciona métodos para emplear polipéptidos ActRIIb y otros antagonistas ActRIIb para promover el crecimiento óseo e incrementar la densidad ósea en humanos, y aumentar asimismo la masa muscular. Los antagonistas ActRIIb incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIb de unión a ligando (v.g., ActRIIb-Fc), anticuerpos que se unen a ActRIIb y rompen la unión de uno o más ligandos, tales como activina o miostatina, proteínas distintas de anticuerpos, seleccionadas para unión ActRIIb (véase v.g., WO/2002/088171, WO/2006/055689, y WO/2002/032925 para ejemplos de tales proteínas y métodos para diseño y selección de las mismas), péptidos aleatorizados, seleccionados para unión ActRIIb, fijados a menudo a un dominio Fc. Dos diferentes proteínas (u otras fracciones) con actividad de unión a ActRIIb, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión tipo I (v.g., un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (v.g., un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, pueden conectarse entre sí para crear una molécula de unión bifuncional. Aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización de ActRIIb se incluyen como antagonistas ActRIIb.

Los términos empleados en esta especificación tienen generalmente sus significados ordinarios en el arte, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que cada término se utiliza. Ciertos términos se discuten a continuación o en alguna otra parte en la especificación, para brindar orientación adicional al facultativo en describir las composiciones y métodos de la invención y cómo hacer uso de ellos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el cual se emplea el término.

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

Alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de cinco veces y preferiblemente

dentro de dos veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en esta especificación son aproximadas, a menos que se especifique lo contrario, significando que el término "alrededor" o "aproximadamente" puede inferirse cuando no se declare expresamente.

Los métodos de la invención pueden incluir los pasos de comparar secuencias entre sí, incluyendo una secuencia silvestre con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones comprenden típicamente alineamientos de secuencias poliméricas, v.g., empleando programas de alineamiento de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en el arte (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, para citar unos pocos). El profesional experto observará fácilmente que, en aquellos alineamientos, en los que una mutación contiene una inserción o deleción de un residuo, el alineamiento de secuencias introducirá un "vacío" (representado normalmente por un guión, o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el residuo insertado o deleccionado.

"Homólogo," en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común," incluyendo proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, o bien en términos de identidad porcentual o bien 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 secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos que pueden compartir o no un origen evolutivo común.

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

2. Polipéptidos ActRIIb

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a polipéptidos ActRIIb. Tal como se emplea en esta especificación, el término "ActRIIb" se refiere a una familia de proteínas tipo IIb de receptor de activina (ActRIIb) de cualquier especie y variantes derivadas de tales proteínas ActRIIb mediante mutagénesis u otra modificación. Se entiende que la referencia a ActRIIb en esta especificación es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActRIIb son generalmente proteínas de transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión de ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático con actividad serina/treonina cinasa predicha.

El término "polipéptido ActRIIb" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de ocurrencia natural de un miembro de la familia ActRIIb, así como cualesquiera variantes de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas), que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, WO/2006/012627, polipéptidos ActRIIb que se incorporan por referencia en esta especificación. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIb incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIb conocido que tenga una secuencia por lo menos alrededor de 80% idéntica con la secuencia de un polipéptido ActRIIb y, opcionalmente, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o una identidad mayor. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIb de la invención puede unirse a una proteína ActRIIb e inhibir su función. Un polipéptido ActRIIb puede seleccionarse con respecto a su actividad en promover la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Ejemplos de polipéptidos ActRIIb incluyen el polipéptido precursor ActRIIb humano (SEQ ID NO: 1) y los polipéptidos ActRIIb humanos solubles (v.g., SEQ ID NO: 2, 3, 13, 17, o 20).

La secuencia de la proteína precursora ActRIIb humana es como sigue:

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERC
EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMND FVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNE~~LCHVAETM~~
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRC~~KAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK~~
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI **SEQ ID NO: 1**

El péptido señal tiene un subrayado simple; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de glicosilación N-enlazados están en cuadros.

La secuencia del polipéptido procesado soluble (extracelular) ActRIIb humano es como sigue:

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG**
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**VYFCCCEGNFCNERFTHLP**
EAGGPEVTYEPPPTAPT **SEQ ID NO: 2**

En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N-terminal. La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" delecionada (una secuencia $\Delta 15$) es como sigue:

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG**
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**VYFCCCEGNFCNERFTHLP**
 EA **SEQ ID NO: 3**

En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N-terminal. La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora ActRIIb humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de la entrada Genbank NM_001106)

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCTATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTTAA
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTTCGGAGGTCCGTCAACGGCACTACCTCG
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA **SEQ ID NO: 4**

La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido (extracelular) soluble ActRIIb humano es como sigue:

TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCA
 ACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG
 CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCT
 GGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT
 GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTA
 CTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTG
 CCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCC
 CCACC **SEQ ID NO: 5**

En una modalidad específica, la invención se refiere a polipéptidos ActRIIb solubles. Como se describe en esta especificación, el término "polipéptido ActRIIb soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIb. El término "polipéptido ActRIIb soluble," tal como se emplea en esta especificación, incluye cualquier dominio extracelular de ocurrencia natural de una proteína ActRIIb, así como cualesquiera variantes de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActRIIb de unión a activina es uno que conserva la capacidad de unirse a activina, incluyendo, por ejemplo, activina AA, AB, BB, o formas que incluyen una subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIb de unión a activina se unirá a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menos. El dominio extracelular de una proteína ActRIIb se une a activina y es generalmente soluble en condiciones fisiológicas y, por consiguiente, puede denominarse como un polipéptido ActRIIb de unión a activina, soluble. Ejemplos de polipéptidos ActRIIb de unión a activina, solubles, incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en SEQ ID NOs: 2, 3, 13, 17, o 20. SEQ ID NO: 13 se denomina como ActRIIb(20-134)-hFc, y se describe con más detalle en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIb solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIb, por ejemplo, la secuencia líder de la melitina de miel de abejas (SEQ ID NO: 14), la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular (TPA - *tissue plasminogen activator*) (SEQ ID NO: 15) o la secuencia líder ActRIIb nativa (SEQ ID NO: 16). El polipéptido ActRIIb-hFc ilustrado en SEQ ID NO: 17 utiliza una secuencia líder TPA.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a polipéptidos de variantes de ActRIIb (v.g., polipéptidos ActRIIb solubles). Opcionalmente, los fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas tienen actividades biológicas idénticas

o similares de sus correspondientes polipéptidos ActRIIb silvestres. Por ejemplo, una variante ActRIIb de la invención puede unirse a un ligando ActRIIb e inhibir su función (v.g., activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido ActRIIb modula el crecimiento de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo o grasa. Ejemplos de polipéptidos ActRIIb incluyen el polipéptido precursor ActRIIb humano (SEQ ID NO: 1), y polipéptidos ActRIIb humanos solubles (v.g., SEQ ID NOs: 2, 3, 13, 17, o 20).

A menos que se indique lo contrario, posiciones de aminoácidos en un polipéptido ActRIIb discutido en esta especificación se hacen con referencia al polipéptido ActRIIb precursor (es decir, SEQ ID NO: 1). Debe entenderse que la posición correspondiente en otro polipéptido ActRIIb puede identificarse fácilmente basándose en la información suministrada en esta especificación. Por ejemplo, el polipéptido ActRIIb precursor contiene una secuencia líder de 19 aminoácidos que no está contenida en la porción extracelular soluble de ActRIIb como se muestra en SEQ ID NO: 2. Por consiguiente, un residuo en la posición X en SEQ ID NO: 1 corresponde al residuo X-19 en SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, el residuo 30 de SEQ ID NO: 1 corresponde al residuo 11 en SEQ ID NO: 2 (véase Figura 12). Una correlación similar puede determinarse para las demás secuencias ActRIIb descritas en esta especificación.

La divulgación identifica porciones funcionalmente activas y variantes de ActRIIb. Los solicitantes han confirmado que una proteína de fusión Fc con la secuencia divulgada por Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15; 83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de SEQ ID NO: 1 (A64), posee una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. Por el contrario, la misma proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por activina y GDF-11 en el rango nanomolar bajo a picomolar alto. Por consiguiente, una secuencia con una R64 se utilice como secuencia de referencia silvestre para ActRIIb humano en esta divulgación.

Attisano et al. (Cell. 1992 Jan 10; 68(1):97-108) mostraron una que una deleción del nudo de prolina en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIb reducía la afinidad del receptor por activina. Una proteína de fusión ActRIIb-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO: 1, "ActRIIb(20-119)-Fc" redujo la unión a GDF-11 y activina en relación con un ActRIIb(20-134)-Fc, que incluye la región nudo de prolina y el dominio completo de yuxtamembrana

(véase La Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0005308). Sin embargo, una proteína ActRIIb(20-129)-Fc conserva una actividad similar pero en cierto modo reducida, en relación con el tipo silvestre, aunque la región nudo de prolina está alterada. En consecuencia, se espera que todos los dominios extracelulares ActRIIb que terminan en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 sean activos, pero constructos que terminan en 134 o 133 pueden ser los más activos. Análogamente, se espera que mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 no alteren la afinidad de unión de ligando con grandes márgenes. En respaldo de esto, mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión de ligando. Por lo tanto, una proteína de fusión ActRIIb-Fc puede terminar ya en el aminoácido 109 (la cisteína final); no obstante, se espera que formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan unión de ligando reducida. El aminoácido 119 está poco conservado y, en consecuencia, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o después conservan la actividad de unión de ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Se ha informado que un ActRIIb(25-118)-hFc es efectivo para inhibir la activina y otros ligandos y para promover la masa muscular y, por lo tanto, tales proteínas ActRIIb-hFc truncadas pueden utilizarse en los métodos descritos en esta especificación (véase Zhou et al., 2010, Cell 142:531-543). Cualquiera de estas formas puede ser deseable para usar, dependiendo del escenario clínico o experimental.

En el extremo N-terminal de ActRIIb, se espera que una proteína que comience en el aminoácido 29, o antes, conserve la actividad de unión de ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación N-enlazada, sin afectar sustancialmente la unión de ligando. Esto confirma que mutaciones en la región entre el péptido de escisión de señal y la región entrecruzada de cisteína, correspondientes a los aminoácidos 20-29, son bien toleradas. En particular, constructos que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 conservarán actividad, y se espera que los constructos que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 29 conserven asimismo actividad. Un constructo que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la máxima actividad (véase Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0005308).

Tomados en conjunto, una porción activa de ActRIIb comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, y los constructos, por ejemplo, pueden

comenzar en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 y terminar en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición desde 20-29 o 21-29 y terminan en una posición desde 118-134, 118-133, 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición desde 20-24 (o 21-24, o 22-25) y terminan en una posición desde 109-134 (o 109-133), 118-134 (o 118-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133). Se contemplan asimismo variantes dentro de estos rangos, particularmente aquellas que tienen por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la porción correspondiente de SEQ ID NO: 2.

Un análisis extensivo de la función de la estructura de ActRIIb se ofrece en la Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0005308, análisis que se incorpora por referencia en esta especificación. Residuos ActRIIb susceptibles de estar en contacto con la cavidad de unión se han definido como residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92, y E94 a F101 de SEQ ID NO: 1. En estas posiciones, se espera que mutaciones conservadoras sean bien toleradas, aunque una mutación K74A es bien tolerada, como son R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es K en *Xenopus*, indicando que aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIb bovino y K en ActRIIb de *Xenopus* y, en consecuencia, aminoácidos incluyendo R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Fuera de estos residuos, se espera que las modificaciones sean relativamente bien toleradas, siempre y cuando tales alteraciones no desestabilicen la estructura de la proteína como un todo. Es fácilmente evidente cuándo una estructura de una proteína está desestabilizada porque la proteína tenderá a expresarse poco o a degradarse en el medio de cultivo. En consecuencia, una fórmula general para una proteína de variante ActRIIb activa es una que comprende los aminoácidos 29-109, pero comenzando opcionalmente en una posición que varía desde 20-24 o 22-25 y terminando en una posición que varía desde 129-134, y que contiene no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios de aminoácidos conservadores en la cavidad de unión de ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en la cavidad de unión de ligando. Tal proteína puede conservar más de 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1. Sitios fuera de la cavidad de unión, en los cuales la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los términos amino y carboxi del

dominio extracelular (como se anotó anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73 de SEQ ID NO: 1. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65 A) mejora efectivamente la unión de ligando en el contexto A64 (*"the A64 background"*) y, por lo tanto, se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión de ligando en el contexto R64. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 en el contexto A62, demostrando así que un cambio significativo en esta región es susceptible de ser tolerado. Mientras que un cambio R64A es poco tolerado, R64K es bien tolerado y, en consecuencia, otro residuo básico, tal como H puede tolerarse en la posición 64.

ActRIIb está bien conservado a través de casi todos los vertebrados, con largos tramos del dominio extracelular conservados completamente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIb están asimismo altamente conservados. En consecuencia, comparaciones de secuencias de ActRIIb de varios organismos vertebrados permiten comprender mejor residuos que pueden estar alterados. Por lo tanto, una variante ActRIIb humana, activa, puede incluir uno o más aminoácidos en posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIb de vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar a ese en la secuencia humana u otra secuencia de vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante ActRIIb activa. L46 del ActRIIb humano es una valina en ActRIIb de *Xenopus*, y así esta posición puede alterarse y, opcionalmente, puede alterarse a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo no polar tal como A. E52 de ActRIIb humano es un K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que este sitio puede ser tolerante de una amplia variedad de cambios, incluyendo residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 de ActRIIb humano es un K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que una amplia variación estructural es tolerada en esta posición, con residuos polares favorecidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G y Y. F108 de ActRIIb humano es un Y en ActRIIb de *Xenopus* y, en consecuencia, Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L debe ser tolerado. E111 de ActRIIb humano es K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 de ActRIIb humano es K en ActRIIb de *Xenopus*, indicando que residuos básicos son tolerados en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 de ActRIIb humano está relativamente poco conservado, y aparece como P en un ActRIIb de roedor y V en ActRIIb de *Xenopus*; por lo tanto, esencialmente cualquier aminoácido debe ser tolerado en esta posición.

41/47

La adición de un sitio de glicosilación N-enlazado adicional (N-X-S/T) incrementa la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIb-Fc, en relación con la forma ActRIIb(R64)-Fc (véase Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0005308). Introduciendo una asparagina en la posición 24 (constructo A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una mayor semivida. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS) de SEQ ID NO: 1, aunque la última puede no estar eficientemente glicosilada con el R en la posición 64. Secuencias N-X-S/T pueden introducirse generalmente en las posiciones fuera de la cavidad de unión de ligando, definida en Figura 13. Sitios particularmente apropiados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134 de SEQ ID NO: 1. Secuencias N-X-S/T pueden introducirse asimismo en el conector entre la secuencia ActRIIb y el Fc u otro componente de fusión. Tal sitio puede introducirse con esfuerzo mínimo insertando un N en la posición correcta con respecto a un S o T pre-existente, o introduciendo un S o T en una posición correspondiente a un N pre-existente. Por lo tanto, alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación N-enlazado son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinadas con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S, que se prevea para glicosilarse, puede alterarse a un T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección conferida por la glicosilación. Análogamente, cualquier T, que se prevea para glicosilarse, puede alterarse a un S. Por lo tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. De manera similar, en una variante A24N, puede usarse una alteración S26T. Por consiguiente, una variante ActRIIb puede incluir una o más secuencias de consenso de glicosilación N-enlazadas, no endógenas, adicionales.

La posición L79 puede alterarse para conferir propiedades de unión activina - miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce la unión GDF-11 en una mayor extensión que la unión de activina. L79E o L79D conserva la unión GDF-11. Notablemente, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión de activina. Experimentos *in vivo* indican que estos receptores distintos de activina conservan una capacidad significativa de incrementar la masa muscular pero muestran efectos disminuidos en otros tejidos. Estos datos demuestran la deseabilidad y factibilidad para obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina.

Las variaciones descritas pueden combinarse en varias formas. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descritos en esta especificación indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIb que a menudo es conveniente conservar. Éstas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo y, particularmente, triptófano), la posición 37 (ácida y, particularmente, ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por consiguiente, en cada una de las variantes divulgadas en esta especificación, la divulgación proporciona un marco de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

En ciertas modalidades, fragmentos aislados de los polipéptidos ActRIIb pueden obtenerse detectando selectivamente ("*by screening*") polipéptidos producidos recombinantemente del correspondiente fragmento del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIb (v.g., SEQ ID NOs: 4 y 5). En adición, pueden sintetizarse químicamente fragmentos, empleando técnicas conocidas en el arte tales como química t-Boc o f-Moc en fase sólida Merrifield convencional. Los fragmentos pueden producirse (recombinantemente o mediante síntesis química) y analizarse para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIb o un ligando ActRIIb.

En ciertas modalidades, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIb tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 13, 17, o 20. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 13, 17, o 20.

En ciertas modalidades, la presente invención contempla elaborar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRIIb para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica, o estabilidad (v.g., vida útil *ex vivo* y resistencia a degradación proteolítica *in vivo*). Pueden producirse asimismo

polipéptidos ActRIIb modificados, por ejemplo, mediante sustitución, delección, o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (v.g., mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIb resulta en un homólogo funcional puede determinarse fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIb de variante de producir una respuesta en células en una manera similar al polipéptido ActRIIb silvestre, o de unirse a uno o más ligandos, tales como activina, GDF-11 o miostatina en una manera similar al silvestre.

En ciertas modalidades específicas, la presente invención contempla realizar mutaciones en el dominio extracelular (denominado también como dominio de unión de ligando) de un polipéptido ActRIIb, de tal manera que el polipéptido ActRIIb de variante (o mutante) tenga actividades alteradas de unión de ligando (v.g., afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, tales polipéptidos ActRIIb de variante tienen afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos ActRIIb de variante tienen especificidad de unión alterada para sus ligandos.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos ActRIIb de variante que se unen preferencialmente a GDF8/GDF11 en relación con activinas. La divulgación establece además la deseabilidad de tales polipéptidos para reducir efectos inespecíficos ("*off-target effects*"), aunque tales variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves en las que pueden necesitarse aumentos muy grandes en masa muscular para un efecto terapéutico y en las que es aceptable algún nivel de efecto inespecífico. Por ejemplo, residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIb, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80, y F101, están en la cavidad de unión de ligando y median la unión a sus ligandos tales como activina y GDF8. En consecuencia, la presente invención proporciona un dominio de unión de ligando alterado (v.g., el dominio de unión GDF8) de un receptor ActRIIb, que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácido. Opcionalmente, el dominio de unión de ligando alterado puede tener una selectividad creciente por un ligando tal como GDF8 en

relación con un dominio de unión de ligando silvestre de un receptor ActRIIb. Para ilustración, estas mutaciones incrementan la selectividad del dominio de unión de ligando alterado para GDF8 sobre activina. Opcionalmente, el dominio de unión de ligando alterado tiene una relación de K_d para unión de activina a K_d para unión de GDF8 que es por lo menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor relativa a la relación para el dominio de unión de ligando silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión de ligando alterado tiene una relación de IC_{50} para inhibir activina a IC_{50} para inhibir GDF8 que es por lo menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor relativa al dominio de unión de ligando silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión de ligando alterado inhibe GDF8 con una IC_{50} por lo menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menos que la IC_{50} para inhibir activina.

Como un ejemplo específico, el residuo de aminoácido positivamente cargado Asp (D80) del dominio de unión de ligando de ActRIIb puede mutarse a un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el polipéptido ActRIIb de variante se una preferencialmente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo conformado por: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo, y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como un ejemplo específico más, el residuo hidrófobo, L79, puede alterarse a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir enormemente la unión de activina, conservando al mismo tiempo la unión de GDF11. Como se reconocerá por una persona de habilidad en el arte, la mayoría de las mutaciones descritas, variantes o modificaciones pueden hacerse en el nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraducciona l o síntesis química. Tales técnicas son bien conocidas en el arte.

En ciertas modalidades, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIb, de manera que alteren la glicosilación de del polipéptido. Sitios de glicosilación ejemplares en polipéptidos ActRIIb se muestran en SEQ ID NO: 1. Tales mutaciones pueden seleccionarse de manera que introduzcan o eliminen uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación O-enlazados o N-enlazados. Los sitios de reconocimiento de glicosilación enlazada a asparagina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (en donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración puede hacerse igualmente por la adición de, o la sustitución por, uno o

más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIb silvestre (para sitios de glicosilación O-enlazada). Una variedad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o las dos de las posiciones de aminoácidos primera o tercera de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o deleción de aminoácido en la segunda posición) resulta en no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de incrementar el número de fracciones carbohidrato en un polipéptido ActRIIb es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRIIb. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar(es) puede(n) fijarse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306, incorporada por referencia en esta especificación. La eliminación de una o más fracciones carbohidrato presentes en un polipéptido ActRIIb puede llevarse a cabo química o enzimáticamente. La desglicosilación química puede incluir, por ejemplo, exposición del polipéptido ActRIIb al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar enlazante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos intacta. La desglicosilación química se describe además por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de fracciones carbohidrato en polipéptidos ActRIIb puede efectuarse mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIb puede ajustarse, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que células de mamífero, levadura, insecto y plantas, todas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden afectarse por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIb para uso en humanos se expresarán en una línea de células de mamífero que proporcione la glicosilación apropiada, tal como las líneas de células HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas de células de expresión de mamífero sean útiles también.

Esta divulgación contempla además un método de generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido ActRIIb, incluyendo, opcionalmente, variantes de truncamiento; grupos ("pools") de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito de detectar selectivamente tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes del polipéptido ActRIIb las cuales tienen propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada, o unión de ligando alterada. Más adelante se proveen una variedad de análisis de detección selectiva, y tales análisis pueden emplearse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRIIb puede detectarse selectivamente en cuanto a su capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIb, para impedir la unión de un ligando ActRIIb a un polipéptido ActRIIb.

La actividad de un polipéptido ActRIIb o sus variantes puede examinarse igualmente en un análisis basado en células o *in vivo*. Por ejemplo, puede evaluarse el efecto de una variante del polipéptido ActRIIb sobre la expresión de genes involucrados en la producción de hueso en un osteoblasto o precursor. Según sea necesario, esto puede realizarse en la presencia de una o más proteínas de ligando ActRIIb recombinantes (v.g., BMP7), y células pueden transfectarse de manera que produzcan un polipéptido ActRIIb y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando ActRIIb. Análogamente, un polipéptido ActRIIb puede administrarse a un ratón u otro animal, y pueden evaluarse una o más propiedades del hueso, tales como densidad o volumen. Puede evaluarse así mismo la velocidad de cicatrización para fracturas de hueso. De manera similar, puede examinarse la actividad de un polipéptido ActRIIb o sus variantes en células de músculo, adipocitos y células neuronales para detectar cualquier efecto sobre el crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los análisis como se describe más adelante. Tales análisis son bien conocidos de manera rutinaria en el arte. Un gen reportero sensible a SMAD puede usarse en tales líneas de células para monitorear efectos sobre la señalización corriente abajo.

Pueden generarse variantes derivadas combinatoriamente, las cuales tienen una potencia selectiva, en relación con un polipéptido ActRIIb de ocurrencia natural. Tales proteínas de variantes, cuando se expresan a partir de constructos de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Análogamente, la mutagénesis puede dar origen a variantes que tienen semividas intracelulares dramáticamente diferentes del polipéptido ActRIIb silvestre

47/49

correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse o bien más estable o bien menos estable a la degradación proteolítica o a otros procesos que resultan en la destrucción, o inactivación de otra manera, de un polipéptido ActRIIb nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar niveles del polipéptido ActRIIb modulando la semivida de los polipéptidos ActRIIb. Por ejemplo, una semivida corta puede dar origen a efectos biológicos más transitorios y, cuando parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estrecho de niveles del polipéptido ActRIIb recombinante en la célula.

En ciertas modalidades, los polipéptidos ActRIIb de la invención pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de las que están naturalmente presentes en los polipéptidos ActRIIb. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIb modificados pueden contener elementos distintos de aminoácidos, tales como polietilén glicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos distintos de aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIb pueden examinarse como se describe en esta especificación para otras variantes del polipéptido ActRIIb. Cuando un polipéptido ActRIIb se produce en células escindiendo una forma nascente del polipéptido ActRIIb, el procesamiento postraducciona puede ser igualmente importante para el plegamiento correcto y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden seleccionarse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActRIIb.

En ciertos aspectos, variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIb incluyen proteínas de fusión que tienen por lo menos una porción de los polipéptidos ActRIIb y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (v.g., un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP - *maltose binding protein*), o albúmina sérica humana. Puede seleccionarse un dominio de fusión de manera que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para

aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el propósito de purificación de afinidad, se utilizan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices se encuentran disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con parejas de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, un dominio de fusión puede seleccionarse de manera que facilite la detección de los polipéptidos ActRIIb. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diferentes proteínas fluorescentes (v.g., GFP) así como "marcas de epítipo," las cuales son usualmente secuencias peptídicas cortas para las cuales se dispone de un anticuerpo específico. Marcas de epítipo bien conocidas, para las cuales se dispone fácilmente de anticuerpos monoclonales específicos, incluyen marcas FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el factor Xa o trombina, lo cual permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y libere así las proteínas recombinantes de allí. Las proteínas liberadas pueden aislarse entonces del dominio de fusión mediante separación cromatográfica subsiguiente. En ciertas modalidades preferidas, un polipéptido ActRIIb se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIb *in vivo* (un dominio "estabilizador").

Por "estabilizador" se da a entender cualquier cosa que aumente la semivida sérica, sin tener en cuenta si esto se debe a destrucción disminuida, depuración reducida por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina son conocidas por conferir propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio rango de proteínas. De igual modo, fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión, que pueden seleccionarse, incluyen dominios multimerizantes (v.g., dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento muscular).

Como un ejemplo específico, la presente invención proporciona una proteína de fusión como un antagonista GDF8 que comprende un dominio extracelular (v.g., unión a GDF8) fusionado a un dominio Fc (v.g., SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK

Preferiblemente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante, que tiene una o más de estas mutaciones (v.g., la mutación Asp-265), posee capacidad reducida de unión al receptor Fcγ en relación con el dominio Fc silvestre. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (v.g., la mutación Asn-434) posee una capacidad creciente de unión al receptor Fc relacionado con la clase I MHC (FcRN), en relación con el dominio Fc silvestre.

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

En ciertas modalidades, los polipéptidos ActRIIb de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIb. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRIIb, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIb o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIb. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIb y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIb), y modificaciones de fracción carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, eliminación de las fracciones carbohidrato de un polipéptido ActRIIb). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIb se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula IgG (v.g., un dominio Fc). Tal como se emplea en esta especificación, el término "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un

50/42

dominio de fusión (v.g., Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino también incluye modificaciones no proteináceas tales como una fracción carbohidrato, o polímero no proteináceo, tal como polietilen glicol.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona formas purificadas y/o aisladas de los polipéptidos ActRIIb, los cuales se aíslan, o en otra forma están sustancialmente libres, de otras proteínas. Los polipéptidos ActRIIb se producirán generalmente por expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

En ciertas modalidades, los polipéptidos ActRIIb (no modificados o modificados) de la invención pueden producirse por una variedad de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, tales polipéptidos ActRIIb pueden sintetizarse usando técnicas de química de proteínas estándar 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). Además, se dispone en el comercio de sintetizadores de péptidos automatizados (v.g., Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, los polipéptidos ActRIIb, fragmentos o variantes de los mismos pueden producirse recombinantemente utilizando varios sistemas de expresión (v.g., *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células COS, baculovirus) como es bien conocido en el arte (véase también más adelante). En una modalidad adicional, los polipéptidos ActRIIb modificados o no modificados pueden producirse por digestión de polipéptidos ActRIIb de longitud completa, producidos recombinantemente o de ocurrencia natural, utilizando, por ejemplo, una proteasa, v.g., tripsina, termolisina, quimiotripsina, pepsina, o enzima convertidora de aminoácidos básicos pareados (PACE - *paired basic amino acid converting enzyme*). Análisis por computador (empleando un software disponible en el comercio, v.g., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) pueden usarse para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, tales polipéptidos ActRIIb pueden producirse de polipéptidos ActRIIb de longitud completa, producidos recombinantemente o de ocurrencia natural, tales como técnicas estándar conocidas en el arte, tales como escisión química (v.g., bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

51/4

3. Ácidos Nucleicos que Codifican Polipéptidos ActRIIb

En ciertos aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos recombinantes y/o aislados que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIb (v.g., polipéptidos ActRIIb solubles y de longitud completa), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión divulgadas en esta especificación. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor ActRIIb humano de ocurrencia natural, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIb. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden utilizarse, por ejemplo, en métodos para elaborar polipéptidos ActRIIb o como agentes terapéuticos directos (v.g., en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos en cuestión que codifican polipéptidos ActRIIb incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO: 4 o 5. Secuencias nucleotídicas de variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones nucleotídicas, tales como variantes alélicas.

En ciertas modalidades, la invención provee secuencias de ácidos nucleicos recombinantes o aislados que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID NOs: 4, 5, o 18. Una persona de habilidad ordinaria en el arte se percatará de que secuencias de ácidos nucleicos complementarias a SEQ ID NOs: 4, 5, o 18 y variantes de SEQ ID NOs: 4, 5, o 18 están también dentro del ámbito de esta invención. En modalidades adicionales, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia nucleotídica heteróloga, o en una genoteca de ADN.

En otras modalidades, los ácidos nucleicos de la invención incluyen además secuencias nucleotídicas, y los polipéptidos ActRIIb codificados por tales ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de alta rigurosidad a la secuencia nucleotídica designada en SEQ ID NOs: 4, 5, o 18, la secuencia complementaria de SEQ ID NOs: 4, 5, o 18, o fragmentos de cualquiera de los anteriores. Tal como se discutió anteriormente, una persona de habilidad ordinaria en el arte entenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de rigurosidad apropiadas que

promuevan la hibridación del ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación con 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45 °C, seguida por un lavado de 2.0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración salina del paso de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de alrededor de 2.0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de alrededor de 0.2 x SSC a 50 °C. Adicionalmente, la temperatura en el paso de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, a condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65 °C. Tanto la temperatura y la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración salina pueden mantenerse constantes mientras se cambia otra variable. En una modalidad, la invención proporciona ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguidas por un lavado con 2 x SSC a temperatura ambiente.

Ácidos nucleicos aislados, que difieren de los ácidos nucleicos como se expone en SEQ ID NOs: 4, 5, o 18 debido a la redundancia en el código genético se encuentran también dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, numerosos aminoácidos se designan por más de un triplete. Codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden resultar en mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. No obstante, se espera que polimorfismos de la secuencia de ADN, que no acarreen cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión, existan entre células de mamífero. Un experto en el arte se percatará de que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta alrededor de 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada, debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas variaciones nucleotídicas similares y polimorfismos de aminoácidos resultantes se encuentran dentro del ámbito de esta invención.

En ciertas modalidades, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden conectarse operacionalmente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en un constructo de expresión. Secuencias nucleotídicas reguladoras serán generalmente apropiadas a la célula hospedadora utilizada para expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas son conocidos en el arte para una variedad de células hospedadoras. Normalmente, las citadas una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden

incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líderes o secuencias señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación transcripcionales, secuencias de inicio y terminación traduccionales, y secuencias activadoras o potenciadoras. Promotores inducibles o constitutivos, como se conocen en el arte, están contemplados por la invención. Los promotores pueden ser o bien promotores de ocurrencia natural, o bien promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula o un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión pueden insertarse en un cromosoma. En una modalidad preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Genes marcadores seleccionables son bien conocidos en el arte y variarán con la célula hospedadora empleada.

En ciertos aspectos de la invención, el ácido nucleico en cuestión se provee en un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido ActRIIb y operacionalmente enlazada a por lo menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en el arte y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIb. En consecuencia, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión, que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se enlaza operacionalmente a ella, puede utilizarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIb. Tales secuencias de control de expresión útiles, incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus o adenovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión se dirige por ARN polimerasa T7, las principales regiones promotoras y operadoras del bacteriófago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, v.g., Pho5, los promotores de los factores de acoplamiento α de levadura ("*the yeast α -mating factors*"), el promotor poliédrico del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de

los anteriores. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Más aún, el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos, deben considerarse igualmente.

Un ácido nucleico recombinante de la invención puede producirse ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector apropiado para expresión en células procariotas, células eucariotas (de levadura, ave, insecto o mamífero), o ambas. 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 expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamífero contienen secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, y una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero, apropiados 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 los fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivados de pREP y p205) pueden usarse para expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales) pueden encontrarse más adelante en la descripción de sistemas de administración de terapia génica. Los diferentes métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son bien conocidos en el arte. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar

55 / 57

los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como el β -gal que contiene pBlueBac III).

En una modalidad preferida, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIb en cuestión en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, los constructos de genes en cuestión pueden emplearse para producir la expresión de los polipéptidos ActRIIb en cuestión en células propagadas en cultivo, v.g., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas de variantes, para purificación.

Esta divulgación concierne igualmente a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante incluyendo una secuencia codificante (v.g., SEQ ID NO: 4, 5, o 18) para uno o más de los polipéptidos ActRIIb en cuestión. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIb de la invención puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (v.g., usando un sistema de expresión de baculovirus), células de levadura, o células de mamífero. Otras células hospedadoras apropiadas son conocidas por los expertos en el arte.

Por consiguiente, la presente invención corresponde además a métodos de producir los polipéptidos ActRIIb en cuestión. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIb puede cultivarse bajo condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido ActRIIb. El polipéptido ActRIIb puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contenga el polipéptido ActRIIb. Alternativamente, el polipéptido ActRIIb puede conservarse citoplasmáticamente o en una fracción de la membrana y las células pueden cosecharse, desintegrarse con lisinas y aislarse la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medio y otros subproductos. Medios apropiados para cultivo de células son bien conocidos en el arte. Los polipéptidos ActRIIb en cuestión pueden aislarse del medio de cultivo celular, células hospedadoras, o ambos, empleando técnicas conocidas en el arte para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de

intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmutaoafinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de los polipéptidos ActRIIb y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ActRIIb (v.g., una columna de proteína A puede usarse para purificar una fusión ActRIIb-Fc). En una modalidad preferida, el polipéptido ActRIIb es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una modalidad preferida, la purificación se obtiene mediante una serie de pasos de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía por exclusión de tamaño, y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de disoluciones amortiguadoras ("*buffer exchange*"). Opcionalmente, un esquema de purificación implica lo siguiente: una columna de proteína A MabSelect™ (GE Healthcare) con proteína en una solución salina amortiguada con Tris (pH 8.0) (TBS), lavada en TBS (150 mM NaCl, pH 8.0) y TBS (50 mM NaCl, pH 8.0), eluida en 0.1 M glicina con pH 3.0; el eluato puede pasarse por una columna de Q sefarosa en TBS pH 8.0 y eluirse en TBS que contiene en un punto cualquiera entre 200-250, 210-250, 220-250, 210-230, 215-225 o 225-235 mM NaCl; el eluato puede cambiarse en 1.1 M NH₄SO₄, 50 mM Tris pH 8.0 y lavarse en la misma disolución amortiguadora, y eluirse en salina amortiguada con fosfato con pH 7.2 o 7.4 en un punto cualquiera entre desde 200-250, 210-250, 220-250, 210-230, 215-225 o 225-235 mM NH₄SO₄. El material eluido puede dializarse, someterse a filtración viral y utilizarse para formulación final.

En otra modalidad, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia del sitio de escisión de una poli-(His)/enterocinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRIIb recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni²⁺. La secuencia líder de purificación pueden eliminarse posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIb purificado (v.g., véase Hochuli et al, (1987) *J. Chromatography* 411:177 y Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Técnicas para elaborar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias

polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando términos de extremo romo o escalonado ("*blunt-ended or stagger-ended termini*") para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar términos apropiados, inserción ("*filling-in*") de extremos cohesivos, según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable, y ligamiento enzimático. En otra modalidad, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan origen a protuberancias complementarias ("*complementary overhangs*") entre dos fragmentos consecutivos de genes, los cuales pueden hibridarse posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Antagonistas ActRIIb de Activina Alternativos

Aunque polipéptidos ActRIIb solubles y, particularmente, fusiones ActRIIb-Fc, son antagonistas preferidos, se espera que otros tipos de antagonistas ActRIIb sean útiles, incluyendo anticuerpos anti-ActRIIb, fragmentos complementarios, ARN de interferencia o ácidos nucleicos ribozima que inhiben la producción de ActRIIb, y otros inhibidores de ActRIIb, particularmente aquellos que alteran la unión de ActRIIb.

Un anticuerpo, que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIb (v.g., un polipéptido ActRIIb soluble) y el cual se une competitivamente a ligando con el polipéptido ActRIIb o inhibe en otra forma la señalización mediada por ActRIIb, puede utilizarse como un antagonista de las actividades del polipéptido ActRIIb.

Usando y inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIb, antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales pueden elaborarse por protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido ActRIIb, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpo, o una proteína de fusión. Técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación a portadores u

otras técnicas bien conocidas en el arte. Una porción inmunogénica de un polipéptido ActRIIb puede administrarse en la presencia de un coadyuvante. La evolución de la inmunización puede monitorearse por detección de concentraciones de anticuerpos en el plasma o el suero. ELISA estándar u otro inmunoanálisis pueden utilizarse con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Luego de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIb, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden cosechar de un animal inmunizado y fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizadas, tales como células de mieloma, para obtener células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en el arte, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Células de hibridoma pueden detectarse selectivamente por medio de inmunoquímica para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido ActRIIb y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

El término "anticuerpo", tal como se emplea en esta especificación, tiene como finalidad incluir anticuerpos enteros, v.g., de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos o dominios de inmunoglobulinas que son reactivos con un antígeno seleccionado. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos detectarse selectivamente con respecto a su utilidad y/o interacción con un epítipo específico de interés. En consecuencia, el término incluye segmentos de porciones escindidas proteolíticamente o preparadas recombinantemente de una molécula de anticuerpo, que son capaces de reaccionar selectivamente con cierta proteína. Ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, y anticuerpos de cadena única (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un conector peptídico. Los scFv's pueden enlazarse covalente o no covalentemente para formar anticuerpos que

59

tienen dos o más sitios de unión. El término anticuerpo incluye asimismo policlonales, monoclonales, u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. El término "anticuerpo recombinante" significa un anticuerpo o dominio de unión de antígeno de una inmunoglobulina, expresado de un ácido nucleico que se ha construido utilizando las técnicas de la biología molecular, tal como un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano, desarrollado de un anticuerpo de cadena única. Anticuerpos de dominio único y cadena única se incluyen asimismo dentro del término "anticuerpo recombinante".

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal y, en ciertas modalidades, la invención pone a disposición métodos para generar anticuerpos novedosos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActRIIb puede incluir administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido antígeno efectivo para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obteniendo células productoras de anticuerpos (v.g., células del bazo) del ratón y fusionando las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y examinar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo de células, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo de células.

El adjetivo "específicamente reactivo con", tal como se emplea en referencia a un anticuerpo, tiene como finalidad significar, como se entiende generalmente en el arte, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (v.g., un polipéptido ActRIIb) y otros antígenos que no son de interés para el cual es útil el anticuerpo, como mínimo, detectando la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos de emplear el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un grado más alto de especificidad en la unión. Generalmente los anticuerpos monoclonales tienen una mayor tendencia (comparados con los anticuerpos policlonales) a discriminar efectivamente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en

la especificidad de una interacción antígeno-anticuerpo es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada puede alcanzarse con un rango de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de alrededor de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M o menos.

Además, las técnicas utilizadas para detectar selectivamente anticuerpos, con el fin de identificar un anticuerpo deseable, pueden influenciar las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo va a usarse para unir un antígeno en solución, puede ser deseable analizar la unión en solución. Se dispone de una variedad de diferentes técnicas para examinar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen ELISAs, análisis de unión con resonancia de plasmón superficial (v.g., el análisis de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), análisis sándwich (v.g., el sistema de microesferas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunotransferencias ("*western blots*"), análisis de inmunoprecipitación, e inmunohistoquímica.

Ejemplos de categorías de compuestos de ácido nucleico que son antagonistas ActRIIb incluyen ácidos nucleicos complementarios, constructos de ARN de interferencia y constructos de ácido nucleico catalítico. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto bicatenario puede incluir asimismo regiones de protuberancia ("*overhang*") o no-complementariedad, en donde una o la otra de las hebras es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de auto-complementariedad, significando que el compuesto forma una así llamada "horquilla" o estructura "tallo-lazo", con una región de estructura helicoidal doble. Un compuesto de ácido puede comprender una secuencia nucleotídica que sea complementaria con una región conformada por no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100, o no más de 50, 35, 25, 22, 20, 18 o 15 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de ActRIIb de longitud completa o secuencia de ácido nucleico o activina β_A , β_B , β_C o β_E . La región de complementariedad tendrá preferiblemente una longitud de por lo menos 8 nucleótidos y, opcionalmente, alrededor de 18 a 35 nucleótidos. Una región de complementariedad puede caer dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no codificante del transcrito diana, tal como la porción de secuencia codificante. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico tendrá de alrededor de 8 a alrededor de 500 nucleótidos o pares de

bases de longitud y, opcionalmente, la longitud será alrededor de 14 a alrededor de 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para uso como un ADN complementario), ARN o un híbrido ARN-ADN. Cualquier hebra puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. De igual manera, un compuesto bicatenario puede ser ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN, y cualquier hebra puede incluir además una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, incluyendo una o más modificaciones al esqueleto (la porción azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo conexiones internucleotídicas) o la porción de la base (la porción purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico complementario tendrá preferiblemente una longitud de alrededor de 15 a alrededor de 30 nucleótidos y, a menudo, contendrá una o más modificaciones para mejorar las características, tales como estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar en el que el compuesto es susceptible de administrarse, tal como el estómago, en el caso de compuestos administrados oralmente, y el pulmón, para compuestos inhalados. En el caso de un constructo ARNi, la hebra complementaria al transcrito diana será generalmente ARN o modificaciones del mismo. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción doble del constructo ARNi de "horquilla" monocatenario o bicatenario tendrá generalmente una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y, opcionalmente, alrededor de 21 a 23 nucleótidos de longitud, siempre que sirva como un sustrato Dicer. Ácidos nucleicos enzimáticos o catalíticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y pueden contener igualmente formas modificadas. Los compuestos de ácido nucleico pueden inhibir la expresión de la diana en alrededor de 50%, 75%, 90% o más, cuando se contactan con células bajo condiciones fisiológicas y con una concentración en la que un control complementario o codificante tiene poco o ningún efecto. Concentraciones preferidas para analizar el efecto de compuestos de ácido nucleico son 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácido nucleico pueden analizarse asimismo para detectar efectos, por ejemplo, sobre niveles de glóbulos rojos.

En ciertas modalidades, un antagonista ActRIIb puede ser un polipéptido de folistatina que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se une a activina. El término "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de ocurrencia natural de folistatina, así como cualesquiera variantes

del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcional de folistatina. Variantes de polipéptidos de folistatina que conservan propiedades de unión de activina pueden identificarse basándose en estudios previos que implican interacciones de folistatina y activina. Por ejemplo, WO2008/030367 divulga dominios específicos de folistatina ("FSDs") que han demostrado ser importantes para la unión de activina. Como se ilustra más adelante en SEQ ID NOs: 9-11, el dominio de folistatina de extremo N-terminal ("FSND" SEQ ID NO: 9), FSD2 (SEQ ID NO: 10) y, en una menor medida, FSD1 (SEQ ID NO: 11) representan dominios ejemplares en la folistatina, importantes para unión de activina. Adicionalmente, métodos para elaborar y analizar bibliotecas de polipéptidos se describen anteriormente en el contexto de los polipéptidos ActRIIb, y tales métodos corresponden también a elaborar y analizar variantes de folistatina. Los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tenga una secuencia por lo menos alrededor de 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina y, opcionalmente, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más de identidad. Ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina madura o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de folistatina humana (SEQ ID NO: 7) como se describe, por ejemplo, en WO2005/025601.

La isoforma del polipéptido precursor de la folistatina humana FST344 es como sigue:

MVRARHQP GGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
 SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDC
 GPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARC
 KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
 SSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
 TGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
 ACSSGVLLLEVKHGSCN**SISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW**

(SEQ ID NO: 7; NP037541.1 ISOFORMA DE FOLISTATINA FST344).

El péptido señal tiene un subrayado simple; los últimos 27 residuos en negrita representan aminoácidos adicionales, comparados con una isoforma de folistatina más corta FST317 (NP006341) a continuación.

63/18

La isoforma del polipéptido precursor de la folistatina humana FST317 es como sigue:

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
 SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDC
 GPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARC
 KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
 SSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
 TGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
 ACSSGVLLLEVKHSGSCN **SEQ ID NO: 8**

El péptido señal tiene un subrayado simple.

La secuencia del dominio de la folistatina de extremo N-terminal (FSND) es como sigue:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWM
 IFNGGAPNCIPCK (**SEQ ID NO: 9; FSND**)

Las secuencias FSD1 y FSD2 son como sigue:

ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (**SEQ ID NO: 10; FSD1**)
 KTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVT (**SEQ ID NO: 11; FSD2**)

En otras modalidades, un antagonista para uso en esta especificación puede ser un gen relacionado tipo folistatina (FLRG – *follistatin-like related gene*) que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se une a activina y otros ligandos con un espectro que asemeja el de ActRIIb-Fc. El término "polipéptido FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de ocurrencia natural de FLRG, así como cualesquiera variantes del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Variantes de polipéptidos FLRG, que conservan propiedades de unión de activina, pueden identificarse empleando métodos rutinarios para analizar las interacciones de FLRG y activina. Véase, por ejemplo, US 6,537,966. Además, métodos para elaborar y analizar bibliotecas de polipéptidos se describen anteriormente en el contexto de los polipéptidos ActRIIb y tales métodos corresponden igualmente a elaborar y analizar variantes de FLRG. Los polipéptidos FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier

FLRG conocido que tenga una secuencia por lo menos alrededor de 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG y, opcionalmente, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más de identidad.

El polipéptido precursor FLRG humano es como sigue:

MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGVSSMSGGNPAPGGVCWLQQGQEATCSL
 VLQTDVTRAECASGNIDTAWSNLTHPGNKINLLGFLGLVHCLPCKDSCD
 GVECGPGKACRMLGGRPRCECAPDCSGLPARLQVCGSDGATYRDECELRA
 ARCRGHPDLSVMYRGRCRKSCEHVVCPRPQSCVVDQTGSAHCVCRAAPC
 VPSSPGQELCGNNNVTYISSCHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPEEPP
 GGESAEENFV (SEQ ID NO: 12; NP_005851)

El péptido señal tiene un subrayado simple.

En ciertas modalidades, variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y los polipéptidos FLRG incluyen una proteína de fusión que tiene por lo menos una porción de los polipéptidos de folistatina o polipéptidos FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que facilitan el aislamiento, la detección, la estabilización o la multimerización del polipéptido. Dominios de fusión apropiados se discuten en detalle anteriormente con referencia a los polipéptidos ActRIIb. En una modalidad, un antagonista es una proteína de fusión que comprende una porción de unión de activina de un polipéptido de folistatina, fusionada a un dominio Fc. En otra modalidad, un antagonista es una proteína de fusión que comprende una porción de unión de activina de un polipéptido FLRG, fusionada a un dominio Fc. Se ha demostrado en la literatura, y por los solicitantes con respecto a FLRG, que la folistatina y el FLRG tienen afinidades por la activina A en el rango picomolar, indicando que estos agentes inhibirán la señalización de activina A en un grado similar a ActRIIb-Fc.

5. Análisis de Detección Selectiva ("Screening")

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere al uso de polipéptidos ActRIIb (v.g., polipéptidos ActRIIb solubles) y activina u otros ligandos ActRIIb para identificar compuestos (agentes), que son agonistas o antagonistas de la vía de señalización ActRIIb. Compuestos identificados mediante esta detección

65

selectiva pueden analizarse para evaluar su capacidad de modular el crecimiento óseo o la mineralización o estimular el crecimiento muscular *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos pueden analizarse posteriormente en modelos con animales para evaluar su capacidad de modular el crecimiento tisular *in vivo*.

Existen numerosas metodologías para detectar selectivamente agentes terapéuticos para modular el crecimiento tisular direccionando polipéptidos ActRIIb. En ciertas modalidades, una detección selectiva de alto rendimiento de compuestos puede llevarse a cabo para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIb sobre el hueso o el músculo. En ciertas modalidades, el análisis se lleva a cabo para detectar selectivamente e identificar compuestos que específicamente inhiben o reducen la unión de un polipéptido ActRIIb a activina u otro ligando. Alternativamente, el análisis puede usarse para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIb a activina u otro ligando. En una modalidad adicional, los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIb.

Una variedad de formatos de análisis será suficiente y, a la luz de la presente divulgación, aquellos no expresamente descritos en esta especificación serán no obstante comprendidos por una persona de habilidad ordinaria en el arte. Como se describe en esta especificación, los compuestos de prueba (agentes) de la invención pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas de ocurrencia natural, sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Compuestos (agentes) a analizarse con respecto a su capacidad de actuar como moduladores de crecimiento tisular pueden producirse, por ejemplo, por bacterias, levadura, plantas u otros organismos (v.g., productos naturales), producirse químicamente (v.g., moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producirse recombinantemente. Compuestos de prueba contemplados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas distintas de peptidilo, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En una modalidad específica, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de alrededor de 2.000 daltons.

Los compuestos de prueba de la invención pueden proveerse como entidades discretas, únicas, o proveerse en bibliotecas de mayor complejidad,

tales como las elaboradas por química combinatoria. Estas bibliotecas pueden incluir, por ejemplo, alcoholes, haluros alquílicos, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en los pasos iniciales de la detección selectiva. Opcionalmente, los compuestos pueden derivarse con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, microesferas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes reticulantes fotoactivables ("*photoactivable crosslinkers*") o cualesquiera combinaciones de los anteriores.

En muchos programas de detección selectiva de medicamentos que analizan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables análisis de alto rendimiento, con el fin de maximizar el número de compuestos explorados en un período dado de tiempo. Análisis que se realizan en sistemas libres de células, tal como pueden derivarse con proteínas purificadas o semi-purificadas, se prefieren a menudo como detecciones selectivas "primarias", porque pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular, que es mediada por un compuesto de prueba. Más aún, los efectos de la toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, enfocándose el análisis en su lugar principalmente en el efecto del medicamento sobre la diana molecular, como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIb y activina.

Solamente para ilustrar, en un análisis ejemplar de detección selectiva de la presente invención, el compuesto de interés se contacta con un polipéptido ActRIIb aislado y purificado, el cual es de ordinario capaz de unirse a activina. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIb se agrega entonces una composición que contiene un ligando ActRIIb. La detección y cuantificación de complejos ActRIIb/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en inhibir (o potenciar) la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIb y activina. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos, usando varias concentraciones del compuesto de prueba. Más aún, un análisis de control puede realizarse igualmente para proporcionar valores de referencia para comparación.

67/A

Por ejemplo, en un análisis de control, activina aislada y purificada se agrega a una composición que contiene el polipéptido ActRIIb, y se cuantifica la formación del complejo ActRIIb/activina en la ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en el cual pueden mezclarse los reactivos puede variar, y pueden mezclarse simultáneamente. Más aún, en lugar de proteínas purificadas, pueden utilizarse extractos y lisados celulares para producir un sistema apropiado de análisis libre de células.

La formación del complejo entre el polipéptido ActRIIb y activina puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando proteínas detectablemente marcadas, tales como polipéptido ActRIIb o activina radiomarcados (v.g., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), fluorescentemente marcados (v.g., FITC), o enzimáticamente marcados, mediante inmunoanálisis, o mediante detección cromatográfica.

En ciertas modalidades, la presente invención contempla el uso de análisis de polarización de fluorescencia y análisis de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET - *fluorescence resonance energy transfer*) en medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIb y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guíasondas ópticos (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de los Estados Unidos No. 5,677,196), resonancia de plasmón superficial (SPR - *surface plasmon resonance*), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas modalidades de la invención.

Más aún, la presente invención contempla el uso de un análisis de detección de interacción ("*interaction trap assay*"), también conocido como el "ensayo de doble híbrido," para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIb y su proteína de unión. Véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; y Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). En una modalidad específica, la presente invención contempla el uso de dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (v.g., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian interacciones entre un polipéptido ActRIIb y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; y Patentes de los Estados

Unidos Nos. 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

En ciertas modalidades, los compuestos en cuestión se identifican por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIb o activina de la invención. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIb o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción puede identificarse a nivel de la proteína empleando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo foto-reticulación, unión de ligando radiomarcado, y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden detectarse selectivamente en un análisis basado en un mecanismo, tal como un análisis para detectar compuestos que se unen a una activina o un polipéptido ActRIIb. Esto puede incluir un acontecimiento de unión de fase sólida o base fluida. Alternativamente, el gen que codifica una activina o un polipéptido ActRIIb puede transfectarse con un sistema reportero (v.g., β -galactosidasa, luciferasa, o proteína fluorescente verde) en una célula y detectarse selectivamente contra la biblioteca, preferiblemente mediante una detección selectiva de alto rendimiento, o con miembros individuales de la biblioteca. Pueden emplearse otros análisis de unión basados en mecanismo, por ejemplo, análisis de unión que detectan variaciones en energía libre. Análisis de unión pueden llevarse a cabo con la diana fijada a un pocillo, microesfera o chip, o capturarse por un anticuerpo inmovilizado o resolverse por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse usualmente utilizando calorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmón superficial.

En ciertos aspectos, la presente invención provee métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación de hueso y aumentar la masa ósea. Por consiguiente, cualquier compuesto identificado puede examinarse en células enteras o tejidos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento óseo o cartilaginoso. Para este propósito pueden utilizarse varios métodos conocidos en el arte.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIb o activina o compuestos de prueba sobre el crecimiento del hueso o cartilago puede determinarse midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos en análisis basados en células (véase, v.g., Daluiski et al, Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al, Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Otro ejemplo de análisis basados en células incluye analizar la actividad osteogénica de los

polipéptidos ActRIIb o activina en cuestión y los compuestos de prueba en células osteoblásticas y progenitores mesenquimatosas. Para ilustración, adenovirus recombinantes que expresan una activina o polipéptido ActRIIb pueden construirse para infectar células C3H10T1/2 progenitoras mesenquimatosas pluripotenciales, células C2C12 preosteoblásticas y células TE-85 osteoblásticas. A continuación se determina la actividad osteogénica midiendo la inducción de fosfatasa alcalina, osteocalcina y mineralización de la matriz (véase, v.g., Cheng et al., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A (8): 1544-52).

De igual manera la presente invención contempla análisis *in vivo* para medir el crecimiento del hueso o cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001) divulgan un modelo osteoporótico con ratas, en el cual se estudia la reparación del hueso durante el primer período después de la fractura. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) divulgan asimismo un modelo osteoporótico con ratas en el cual se estudia el período posterior después de la fractura. Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537 describen un modelo de osteoporosis con ratones, en el cual se les extirpó quirúrgicamente el ovario a los ratones hembra, lo cual hace que los ratones hembra pierdan un contenido mineral óseo sustancial y densidad mineral ósea, perdiendo el hueso trabecular más o menos el 50% de la densidad mineral ósea. La densidad ósea podía incrementarse en los ratones hembra, a las que se extirpó quirúrgicamente el ovario, mediante la administración de factores tales como hormona paratiroidea. En ciertos aspectos, la presente invención hace uso de análisis de cicatrización de fracturas que son conocidos en el arte. Estos análisis incluyen técnica de fracturas, análisis histológicos y análisis biomecánicos, los cuales se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6,521,750, la cual se incorpora por referencia en su totalidad por su divulgación de protocolos experimentales para producir, así como mediar, la extensión de fracturas, y el proceso de reparación.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos y agentes para estimular el crecimiento muscular y aumentar la masa muscular, por ejemplo, antagonizando las funciones de un polipéptido ActRIIb y/o un ligando ActRIIb. Por consiguiente, cualquier compuesto identificado puede examinarse en células enteras o tejidos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad de modular el crecimiento muscular. Para este propósito pueden utilizarse varios métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, métodos de la invención se llevan a cabo de

70

manera que la transducción de señales por una proteína ActRIIb activada por unión a un ligando ActRIIb (v.g., GDF8) se haya reducido o inhibido. Se reconocerá que el crecimiento de tejido muscular en el organismo resultaría en una masa muscular aumentada en el organismo, comparada con la masa muscular de un organismo correspondiente (o población de organismos) en el cual la transducción de señales por una proteína ActRIIb no hubiera sido afectada en esa forma.

Por ejemplo, el efecto de los polipéptidos ActRIIb o compuestos de prueba sobre el crecimiento/proliferación de las células musculares puede determinarse midiendo la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, los cuales se asocian con la proliferación de células miogénicas, y la expresión génica de MyoD que se asocia con la diferenciación muscular (v.g., Amthor et al., Dev Biol. 2002, 251:241-57). Se sabe que GDF8 regula por disminución la expresión génica de Pax-3 y Myf-5, e impide la expresión génica de MyoD. Se espera que los polipéptidos ActRIIb o los compuestos de prueba antagonicen esta actividad de GDF8. Otro ejemplo de análisis basados en células incluye medir la proliferación de mioblastos tales como los mioblastos C(2)C(12) en la presencia de los polipéptidos ActRIIb o los compuestos de prueba (v.g., Thomas et al., J Biol Chem. 2000, 275:40235-43).

La presente invención contempla igualmente análisis *in vivo* para medir la masa y la fuerza muscular. Por ejemplo, Whittemore et al. (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71) divulgan un método de medir la masa músculo-esquelética aumentada y la fuerza de agarre incrementada en ratones. Opcionalmente, este método puede utilizarse para determinar los efectos terapéuticos de los compuestos de prueba (v.g., polipéptidos ActRIIb) sobre las enfermedades o afecciones musculares, por ejemplo, aquellas enfermedades en las cuales la masa muscular se limita.

Se entiende que los análisis de detección selectiva de la presente invención se aplican no sólo a los polipéptidos ActRIIb en cuestión y a variantes de los polipéptidos ActRIIb, sino también a cualesquiera compuestos de prueba, incluyendo agonistas y antagonistas de los polipéptidos ActRIIb. Además, estos análisis de detección selectiva son útiles para fines de verificación específica y control de calidad de medicamentos.

H 28

6. Usos Terapéuticos Ejemplares

En ciertas modalidades, antagonistas ActRIIb (v.g., polipéptidos ActRIIb) de la presente invención pueden emplearse para estimular el crecimiento anabólico óseo, tratar un tumor óseo osteolítico, y/o tratar o prevenir una enfermedad o afección que se beneficiaría del crecimiento muscular. En ciertas modalidades, antagonistas ActRIIb y, particularmente, constructos ActRIIb-Fc, pueden usarse para tratar o prevenir la pérdida ósea relacionada con el cáncer. En ciertas modalidades, la presente invención provee métodos de tratar y prevenir el daño óseo en un individuo necesitado de tratamiento, administrando al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista ActRIIb, particularmente un polipéptido ActRIIb. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona métodos de promover el crecimiento óseo o mineralización en un individuo necesitado de ello, administrando al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista ActRIIb, particularmente un polipéptido ActRIIb. Estos métodos se orientan preferiblemente a tratamientos terapéuticos o profilácticos de animales y, más preferiblemente, humanos. En ciertas modalidades, la divulgación posibilita el uso de antagonistas ActRIIb (particularmente polipéptidos ActRIIb solubles y anticuerpos neutralizadores dirigidos a ActRIIb) para el tratamiento de trastornos asociados con una baja densidad ósea o resistencia ósea disminuida.

Tal como se emplea en esta especificación, un medicamento que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la ocurrencia del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con una muestra de control no tratada. El término "tratar", tal como se emplea en esta especificación incluye profilaxis de la afección mencionada o mejora o eliminación de la enfermedad una vez se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o tratamiento pueden discernirse en el diagnóstico entregado por un médico y el resultado deseado de la administración del agente terapéutico.

La divulgación ofrece métodos de inducir la formación de hueso y/o cartílago, prevenir la pérdida ósea, incrementar la mineralización ósea o impedir la desmineralización del hueso. Por ejemplo, los antagonistas ActRIIb en cuestión tienen aplicación en tratar osteoporosis y la cicatrización de fracturas de los huesos y defectos de los cartílagos en humanos y otros animales. Los polipéptidos

ActRIIb pueden ser útiles en pacientes a quienes se les diagnostica una densidad ósea baja subclínica, como una medida de protección contra el desarrollo de osteoporosis.

En una modalidad específica, métodos y composiciones de la presente invención pueden encontrar utilidad médica en la cicatrización de fracturas de los huesos y defectos de cartílagos en humanos y otros animales. Asimismo, los métodos y composiciones en cuestión pueden tener uso profiláctico en reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas, e igualmente en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación ósea *de novo*, inducida por un agente osteogénico, contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por trauma, o inducidos por resección oncológica, y es útil además en cirugía plástica cosmética. En ciertos casos, los antagonistas ActRIIb en cuestión pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Los antagonistas ActRIIb de la invención pueden ser también útiles en el tratamiento de osteoporosis.

Métodos y composiciones de la invención pueden aplicarse a enfermedades caracterizadas por, o causantes de, pérdida ósea, tales como osteoporosis (incluyendo osteoporosis secundaria), hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, enfermedad de Paget, tirotoxicosis, estado diarreico crónico hipoabsorción, nefropatía, acidosis tubular renal, o anorexia nerviosa.

La osteoporosis ser causada por, o asociarse con, varios factores. Ser mujer, particularmente una mujer posmenopáusica, tener un bajo peso corporal y llevar un estilo de vida sedentario son todos factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de la densidad mineral ósea, que acarrea riesgo de fractura). Las personas que presentan cualquiera de los siguientes perfiles pueden ser candidatos para tratamiento con un antagonista ActRIIb: una mujer posmenopáusica y que no toma estrógeno u otra terapia de reemplazo hormonal; un individuo con una historia personal o maternal de fractura de cadera o que fuma; una mujer posmenopáusica que sea alta (más de cinco pies y 7 pulgadas) o flaca (menos de 125 libras); un hombre con enfermedades clínicas asociadas con pérdida ósea; una persona que usa medicamentos que son conocidos por causar pérdida ósea, incluyendo corticosteroides tales como Prednisone™, varias medicinas anticonvulsivas tales como Dilantin™ y ciertos barbituratos, o

73/16

medicamentos de reemplazo tiroideo en dosis altas; una persona con enfermedad hepática o un historial familiar de osteoporosis; una persona que tiene un elevado recambio óseo (v.g., colágeno excesivo en muestras de orina); una persona con una enfermedad tiroidea, tal como hipertiroidismo; una persona que ha sufrido una fractura después de solamente un trauma moderado; una persona que tiene evidencia por rayos x de fractura vertebral u otros signos de osteoporosis.

Como se anotó anteriormente, la osteoporosis puede resultar asimismo como una enfermedad asociada con otro trastorno o del uso de ciertos medicamentos. La osteoporosis resultante de fármacos u otra afección clínica se conoce como osteoporosis secundaria. En una enfermedad conocida como enfermedad de Cushing, la cantidad en exceso de cortisol producido por el cuerpo se traduce en osteoporosis y fracturas. Los medicamentos más comunes asociados con osteoporosis secundaria son los corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Aunque niveles adecuados de hormonas tiroideas (las cuales son producidas por la glándula tiroidea) se necesitan para el desarrollo del esqueleto, la hormona tiroidea en exceso puede disminuir la masa ósea con el transcurso del tiempo. Otras medicinas que pueden causar osteoporosis secundaria incluyen fentoína (dilantina) y barbituratos que se utilizan para prevenir convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un fármaco para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunitarios; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un medicamento utilizado para tratar algunas enfermedades autoinmunitarias y para suprimir el sistema inmunitario en pacientes con trasplante de órganos; agonistas de la luterina (Lupron, Zoladex), usado para tratar cáncer de próstata y endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), un medicamento anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), empleados para tratar colesterol alto.

La pérdida ósea resultante de la terapia del cáncer es ampliamente reconocida y se denomina pérdida ósea inducida por terapia del cáncer (CTIBL - *cancer therapy induced bone loss*). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden corregirse por el tratamiento con antagonistas ActRIIb.

En una modalidad preferida, antagonistas ActRIIb, particularmente un ActRIIb soluble, divulgados en esta especificación, pueden usarse con pacientes con cáncer. Como se demuestra en esta especificación, una proteína de fusión

ActRIIb-Fc es capaz de promover el crecimiento óseo anabólico en pacientes humanos. Se ha demostrado que agentes óseos anabólicos son útiles para tratar mieloma múltiple (véase v.g., Yaccoby *et al.*, Blood, 109(5):2106-11 (2007); Oyajobi *et al.*, Br J Haematol. 139(3):434-8 (2007); Fulciniti *et al.*, Blood, 114(2): 371-9 (2009); Stewart *et al.* Journal of Cellular Biochemistry 98:1-13 (2006)). En consecuencia, se cree que los antagonistas ActRIIb de activina descritos en esta especificación son útiles para tratar mieloma múltiple y otros tumores óseos. Pacientes con ciertos tumores (v.g. próstata, mama, mieloma múltiple o cualquier tumor que cause hiperparatiroidismo) están en alto riesgo de pérdida ósea debida a pérdida ósea inducida por el tumor, así como metástasis óseas y agentes terapéuticos. Tales pacientes pueden tratarse con antagonistas ActRIIb incluso en la ausencia de evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas. Los pacientes pueden monitorearse asimismo para detectar evidencia de pérdida ósea o metástasis óseas, y pueden tratarse con antagonistas ActRIIb en el caso de que indicadores sugieran un riesgo creciente. Generalmente, gammagrafías DEXA se emplean para evaluar cambios en la densidad ósea, si bien pueden emplearse indicadores de remodelación ósea para evaluar la probabilidad de metástasis óseas. Pueden monitorearse marcadores séricos. La fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP - *bone specific alkaline phosphatase*) es una enzima que está presente en osteoblastos. Las concentraciones de BSAP en la sangre están incrementadas en pacientes con metástasis ósea y otras enfermedades que resultan en una remodelación ósea cada vez mayor. Los péptidos de osteocalcina y procolágeno se asocian también con formación ósea y metástasis óseas. Incrementos en BSAP se han detectado en pacientes con metástasis óseas causadas por cáncer de próstata y, en una menor extensión, en metástasis óseas de cáncer de mama. Las concentraciones de la proteína-7 morfogenética ósea (BMP-7 - *Bone Morphogenetic Protein-7*) son altas en cáncer de próstata que ha hecho metástasis al hueso, pero no en metástasis óseas debidas a cáncer de vejiga, piel, hígado, o pulmón. El telopéptido carboxi-terminal tipo I (ICTP - *type I carboxy-terminal telopeptide*) es un enlace cruzado hallado en colágeno que se forma durante la resorción de hueso. Puesto que el hueso se descompone y reforma constantemente, el ICTP se encontrará en todo el cuerpo. No obstante, en el sitio de metástasis ósea, la concentración será significativamente mayor que en un área de hueso normal. El ICTP ha sido hallado en altas concentraciones en metástasis óseas debidas a cáncer de próstata, pulmón y mama. Otro enlace cruzado de colágeno, el telopéptido N-terminal tipo I (NTx), se produce junto con el ICTP durante el recambio óseo. La cantidad de NTx se incrementa en las

75

metastasis óseas causadas por muchos diferentes tipos de cáncer incluyendo cáncer de pulmón, próstata y mama. Asimismo, las concentraciones de NTx aumentan con la evolución de las metástasis óseas. En consecuencia, este marcador puede utilizarse tanto para detectar metástasis así como para medir la extensión de la enfermedad. Otros marcadores de resorción incluyen piridinolina y deoxipiridinolina. Cualquier aumento en los marcadores de resorción o marcadores de metástasis óseas indican la necesidad de terapia con antagonistas ActRIIb en un paciente.

Debido a que ActRIIb-Fc tiene un claro efecto sobre los marcadores de la actividad de los osteoblastos (v.g., concentraciones de BSAP), las moléculas ActRIIb-Fc pueden ser particularmente útiles en escenarios de pérdida ósea relacionada con cáncer, en los que la enfermedad ósea es de índole osteolítica, más que de índole osteoblástica. Esto es normalmente cierto de mieloma múltiple y metastasis óseas provenientes de una variedad de tumores. Sin embargo, las metastasis óseas de cáncer de próstata en particular tienen una tendencia a ser de índole osteoblástica, y proteínas de fusión ActRIIb-Fc pueden no ser benéficas en este escenario.

Los antagonistas ActRIIb pueden administrarse conjuntamente con otros agentes farmacéuticos. La administración conjunta puede llevarse a cabo mediante administración de una co-formulación única, mediante administración simultánea o mediante administración en tiempos separados. Los antagonistas ActRIIb pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros agentes de actividad ósea. Un paciente puede beneficiarse de recibir conjuntamente un antagonista ActRIIb y tomar suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio apropiado y/o, en algunos casos, otra medicina. Ejemplos de otras medicinas incluyen bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos y raloxifeno afectan el ciclo de remodelación ósea y se clasifican como medicamentos anti-resorbentes. La remodelación ósea consta de dos etapas distintas: resorción ósea y formación ósea. Los medicamentos anti-resorbentes desaceleran o detienen la porción resorbente ósea del ciclo de remodelación ósea pero no desaceleran la porción formadora de hueso del ciclo. Como resultado, la nueva formación continúa con un índice mayor que la resorción ósea, y la densidad ósea puede aumentar con el tiempo. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, incrementa el índice de formación

ósea en el ciclo de remodelación del hueso. El alendronato está aprobado tanto para la prevención (5 mg por día o 35 mg una vez a la semana) como tratamiento (10 mg por día o 70 mg una vez a la semana) de la osteoporosis posmenopáusica. El alendronato disminuye la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna, muñeca y cadera. El alendronato está también aprobado para el tratamiento de osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres, como resultado del uso a largo plazo de estas medicinas (es decir, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de osteoporosis en hombres. El alendronato más vitamina D está aprobado para el tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (70 mg una vez a la semana más vitamina D), y para el tratamiento para mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis. El ibandronato está aprobado para la prevención y tratamiento de osteoporosis posmenopáusica. Tomado como una píldora una vez al mes (150 mg), el ibandronato debe tomarse el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, incrementa la densidad ósea y disminuye el riesgo de fracturas de columna. El risedronato está aprobado para la prevención y tratamiento de osteoporosis posmenopáusica. Tomado diariamente (dosis de 5 mg) o semanalmente (dosis de 35 mg o dosis de 35 mg con calcio), el risedronato desacelera la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de la columna y fracturas distintas de la columna. El risedronato está igualmente aprobado para uso por hombres y mujeres para prevenir y/o tratar osteoporosis inducida por glucocorticoides, que resulta del uso a largo plazo de estos medicamentos (es decir, prednisona o cortisona). La calcitonina es una hormona de ocurrencia natural involucrada en la regulación del calcio y el metabolismo óseo. En mujeres que están más de 5 años más allá de la menopausia, la calcitonina retrasa la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea de la columna y puede aliviar el dolor asociado con fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de fracturas de la columna. La calcitonina se encuentra disponible como inyección (50-100 IU diariamente) o atomizador nasal (200 IU diariamente). La terapia con estrógenos (ET – *estrogen therapy*)/hormonas (HT – *hormone therapy*) está aprobada para la prevención de osteoporosis. Se ha demostrado que la ET reduce la pérdida ósea, incrementa la densidad ósea tanto en la columna como la cadera y disminuye el riesgo de fracturas de la columna y la cadera en mujeres posmenopáusicas. La ET se administra muy comúnmente en la forma de una píldora o parche cutáneo que libera una dosis baja de aproximadamente 0.3 mg diariamente o una dosis estándar de aproximadamente 0.625 mg diariamente y es efectiva incluso cuando se inicia después de la edad de

77 39

los 70 años. Cuando el estrógeno se toma solo, puede incrementar el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer del revestimiento uterino (cáncer endometrial). Para eliminar este riesgo, los proveedores de servicios médicos prescriben la hormona progestina en combinación con estrógeno (terapia de reemplazo hormonal o HT) para aquellas mujeres que tienen un útero intacto. ET/HT alivia los síntomas de la menopausia, y se ha demostrado que posee un efecto benéfico sobre la salud de los huesos. Los efectos secundarios incluyen sangrado vaginal, dolor con la palpación de la mama, alteraciones del estado de ánimo y enfermedad de la vesícula biliar. El raloxifeno, 60 mg al día, está aprobado para la prevención y tratamiento de osteoporosis posmenopáusica. Forma parte de una clase de medicamentos llamados moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs - *Selective Estrogen Receptor Modulators*), que se han desarrollado para proporcionar los efectos benéficos de los estrógenos sin sus desventajas potenciales. El raloxifeno incrementa la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de la columna. Aún no se dispone de datos para demostrar que el raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras fracturas distintas de cadera. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y hombres que están en alto riesgo de una fractura. Esta medicina estimula la nueva formación ósea y aumenta significativamente la densidad mineral ósea. En mujeres posmenopáusicas, la disminución de fracturas se observó en la columna, cadera, pie, costillas y muñeca. En hombres, la reducción de fracturas se observó en la columna, pero no había datos suficientes para evaluar la disminución de fracturas en otros sitios. La teriparatida se autoadministra como una inyección diaria durante hasta 24 meses.

Como se muestra en esta especificación, los antagonistas ActRIIb son también útiles en promover el crecimiento muscular y, como tales, pueden ser útiles en un hospedador de trastornos relacionados con los músculos. Enfermedades ejemplares relacionadas con los músculos incluyen trastornos neuromusculares (v.g., distrofia muscular y atrofia muscular), enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y atrofia muscular progresiva asociada con COPD – *congestive obstructive pulmonary disease*), síndrome de atrofia muscular progresiva, sarcopenia, caquexia, trastornos del tejido adiposo (v.g., obesidad), diabetes tipo 2 y enfermedad degenerativa ósea (v.g., osteoporosis). Otras afecciones ejemplares incluyen trastornos musculodegenerativos y neuromusculares, reparación tisular (v.g., cicatrización de heridas), enfermedades

neurodegenerativas (v.g., esclerosis lateral amiotrófica), trastornos inmunológicos (v.g., trastornos relacionados con la proliferación o función anormales de linfocitos) y obesidad o trastornos relacionados con la proliferación anormal de adipocitos.

En ciertas modalidades, los antagonistas ActRIIb se emplean como parte de un tratamiento para una distrofia muscular. El término "distrofia muscular" se refiere al grupo de enfermedades musculares degenerativas, caracterizadas por debilitamiento y deterioro gradual de los músculos esqueléticos y, algunas veces, los músculos cardíacos y respiratorios. Las distrofias musculares son trastornos genéticos caracterizados por atrofia muscular progresiva y debilidad, que comienzan con cambios microscópicos en el músculo. Como los músculos se degeneran con el tiempo, decae la fuerza muscular de la persona. Distrofias musculares ejemplares, que pueden tratarse con un régimen que incluye los polipéptidos ActRIIb en cuestión, comprenden: distrofia muscular de Duchenne (DMD - *Duchenne Muscular Dystrophy*), distrofia muscular de Becker (BMD - *Becker Muscular Dystrophy*), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD - *Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy*), distrofia muscular de Limb-Girdle (LGMD - *Limb-Girdle Muscular Dystrophy*), distrofia muscular facioescapulohumeral (FSH o FSHD - *Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy*) (también conocida como Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (MMD - *Myotonic Dystrophy*) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (OPMD - *Oculopharyngeal Muscular Dystrophy*), distrofia muscular distal (DD - *Distal Muscular Dystrophy*), distrofia muscular congénita (CMD - *Congenital Muscular Dystrophy*).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) se describió por primera vez por el neurólogo francés Guillaume Benjamin Amand Duchenne en la década de 1860. La distrofia muscular de Becker (BMD) recibió su nombre del médico alemán Peter Emil Becker, quien describió por primera vez su variante de DMD en la década de 1950. La DMD es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en machos, afectando uno entre 3.500 niños. La DMD ocurre cuando se altera el gen de la distrofina, localizado en el brazo corto del cromosoma X. Puesto que los machos portan únicamente una copia del cromosoma X, sólo tienen una copia del gen de la distrofina. Sin la proteína distrofina, el músculo se daña fácilmente durante ciclos de contracción y relajación. Aunque en las fases tempranas de la enfermedad el músculo se compensa por regeneración, más tarde las células progenitoras musculares no pueden mantener el ritmo con el daño permanente, y

el músculo sano se reemplaza por tejido fibro-graso no funcional. Un efecto doble sobre el músculo y el hueso puede ser útil en pacientes con distrofia muscular.

La BMD resulta de diferentes mutaciones en el gen de la distrofina. Los pacientes con BMD tienen alguna distrofina, pero o bien es insuficiente en cantidad o bien pobre en calidad. Tener alguna distrofina protege los músculos de aquellas personas con BMD de degenerarse tan seria o rápidamente como aquellas personas con DMD.

Por ejemplo, investigaciones recientes demuestran que bloquear o eliminar la función de GDF8 (un ligando ActRIIb) *in vivo* puede tratar efectivamente por lo menos ciertos síntomas en pacientes con DMD y BMD. Por consiguiente, los antagonistas ActRIIb en cuestión pueden actuar como inhibidores de GDF8 (antagonistas) y constituyen un medio alternativo de bloquear las funciones de GDF8 y/o ActRIIb *in vivo* en pacientes con DMD y BMD. Se ha demostrado que una proteína ActRIIb-Fc aumenta la masa muscular en un modelo con ratones de distrofia muscular (véase Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0005308).

De modo semejante, los antagonistas ActRIIb en cuestión proporcionan un medio efectivo de aumentar la masa muscular en otros estados patológicos que requieren crecimiento muscular. Por ejemplo, ALS, también llamada enfermedad de Lou Gehrig (enfermedad de las neuronas motoras) es un desorden crónico del sistema nervioso central (CNS – *central nervous system*), incurable e imparable, que ataca las neuronas motoras, componentes del CNS que conectan el cerebro a los músculos esqueléticos. En ALS, las neuronas motoras se deterioran y, eventualmente, mueren, y aunque un cerebro de una persona permanece por lo general funcionando completamente y alerta, la orden de mover nunca llega a los músculos. La mayoría de las personas que adquieren ALS tienen edades entre los 40 y los 70 años. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son aquellas que llevan a los brazos o las piernas. Las personas con ALS pueden tener problemas al caminar, pueden dejar caer cosas, caerse, articular mal las palabras y reír o llorar en forma incontrolable. Eventualmente, los músculos en las extremidades empiezan a atrofiarse por la falta de uso. Esta debilidad muscular se volverá debilitante, y una persona necesitará una silla de ruedas o no podrá bajarse de la cama. La mayoría de los pacientes con ALS mueren de falla respiratoria o de complicaciones de ayuda ventilatoria como neumonía, 3-5 años a partir de la aparición de la enfermedad. Se ha demostrado que una proteína

ActRIIb-Fc mejora la apariencia, la masa muscular y los años de vida de un modelo de ALS con ratones (véase Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0005308).

La masa muscular incrementada, inducida por los antagonistas ActRIIb, podría beneficiar también a aquellas personas que sufren de enfermedades de distrofia muscular progresiva. Se ha observado que la expresión de GDF8 se correlaciona inversamente con la masa libre de grasa en humanos y que la mayor expresión del gen GDF8 se asocia con pérdida de peso en hombres con síndrome de distrofia muscular progresiva en pacientes con SIDA. Inhibiendo la función de GDF8 en pacientes con SIDA, por lo menos ciertos síntomas de SIDA pueden aliviarse, si no eliminarse completamente, mejorando así significativamente la calidad de vida en pacientes con SIDA.

Puesto que la pérdida de la función de GDF8 (un ligando ActRIIb) se asocia igualmente con la pérdida de grasa sin disminución de la ingesta de nutrientes, los antagonistas ActRIIb en cuestión pueden usarse además como un agente terapéutico para desacelerar o prevenir el desarrollo de obesidad y diabetes tipo II.

Este enfoque se confirma y respalda por los datos mostrados en esta especificación, mediante los cuales se demostró que una proteína ActRIIb-Fc mejora la condición metabólica en ratones obesos.

El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer se encuentra entre los aspectos más debilitantes y con peligro de muerte del cáncer. La pérdida progresiva de peso en el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer es una característica común de muchos tipos de cáncer y es reponsable no sólo de una pobre calidad de vida y respuesta deficiente a la quimioterapia, sino también de un período de supervivencia más corto que el encontrado en pacientes con tumores comparables sin pérdida de peso. Asociada con anorexia, consunción de grasa y tejido muscular, angustia psicológica y una menor calidad de vida, la caquexia surge de una compleja interacción entre el cáncer y el hospedador. Es una de las causas más comunes de muerte entre pacientes con cáncer y está presente en 80% de los que mueren. Es un ejemplo complejo del metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas que producen síndrome metabólico. Los tumores producen anomalías tanto directas como indirectas, con el resultado de anorexia y pérdida de peso. Actualmente, no existe tratamiento para controlar o reversar el proceso.

El síndrome de anorexia-caquexia por cáncer afecta la producción de citocinas, la liberación de factores movilizadores de lípidos e inductores de proteólisis, y alteraciones en el metabolismo intermedio. Aunque la anorexia es común, una ingesta disminuida de alimentos no puede explicar solamente los cambios en la composición corporal observada en pacientes con cáncer, y una ingesta cada vez mayor de nutrientes es incapaz de revertir el síndrome de consunción. La caquexia debe sospecharse en pacientes con cáncer si ocurre una pérdida de peso involuntaria de más del 5% del peso premórbido dentro de un período de seis meses.

Puesto que se ha demostrado que la sobreexpresión sistémica de GDF8 en ratones adultos induce una pérdida de músculo profundo y grasa, análoga a la observada en síndromes de caquexia humana, los antagonistas ActRIIb en cuestión, como composiciones farmacéuticas, pueden usarse beneficiosamente para prevenir, tratar, o aliviar los síntomas del síndrome de la caquexia, en donde se desea crecimiento muscular.

En otras modalidades, la presente invención provee composiciones y métodos para regular el contenido de grasa del cuerpo en un animal y para tratar o prevenir enfermedades y, particularmente, enfermedades que comprometen la salud, relacionadas con este fenómeno. De acuerdo con la presente invención, regular (controlar) el peso corporal puede referirse a reducir o aumentar el peso corporal, reducir o incrementar el índice de aumento de peso, o aumentar o reducir el índice de pérdida de peso, e incluye además mantener activamente, o no modificar significativamente el peso corporal (v.g., contra influencias externas o internas que, de lo contrario, pueden aumentar o disminuir el peso corporal). Una modalidad de la presente invención se refiere a regular el peso corporal administrando a un animal (v.g., un humano), necesitado de ello, un antagonista ActRIIb.

En una modalidad específica, la presente invención se refiere a métodos y compuestos para reducir el peso corporal y/o reducir el aumento de peso en un animal y, más particularmente, para tratar o mejorar obesidad en pacientes con riesgo de obesidad o de sufrir de ella. En otra modalidad específica, la presente invención se dirige a métodos y compuestos para tratar un animal que es incapaz de aumentar o retener peso (v.g., un animal con síndrome de consunción). Tales métodos son efectivos para incrementar el peso y/o masa corporal, o para reducir

peso y/o pérdida de masa, o para mejorar afecciones asociadas con, o causadas por, peso corporal y/o masa indeseablemente bajos (v.g., malsanos).

7. Posología

En ciertas modalidades, la divulgación provee métodos para dosificación de un paciente con un polipéptido ActRIIb. Los métodos de la divulgación incluyen administrar una proteína ActRIIb a un paciente en una pauta posológica que proporciona una concentración sérica óptima de la proteína ActRIIb, la cual se mantiene durante un período deseado de tiempo. Un paciente puede medicarse en una pauta que incluya una combinación deseada de un polipéptido ActRIIb administrado al paciente, así como la frecuencia con la cual el polipéptido ActRIIb se administra al paciente. Un polipéptido ActRIIb para uso en una pauta posológica similar puede ser cualquiera de los divulgados en esta especificación, tal como un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 13, 17, o 20, o que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 13, 17, o 20. Un polipéptido ActRIIb puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIb natural, tal como uno que comprende por lo menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-3 o una secuencia de SEQ ID NO: 2, que carece de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola"). En ciertas modalidades el polipéptido ActRIIb comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de identidad con una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal del polipéptido ActRIIb corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal del polipéptido ActRIIb corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1. En modalidades preferidas, el polipéptido ActRIIb es una proteína de fusión ActRIIb-Fc divulgada en esta especificación.

Un paciente puede medicarse de manera que alcance una concentración sérica óptima del polipéptido ActRIIb. Una concentración sérica óptima puede ser, por ejemplo, una concentración sérica que es suficiente para promover un efecto biológico deseado *in vivo*. Tales efectos biológicos incluyen cualquiera de los efectos terapéuticos divulgados en esta especificación, incluyendo promover el crecimiento óseo, incrementar la densidad ósea, tratar o prevenir un trastorno

asociado con una densidad ósea baja, tratar trastornos neuromusculares, trastornos de tejido adiposo, trastornos metabólicos, trastornos neurodegenerativos, trastornos de atrofia muscular progresiva, o cáncer.

Como se divulga en esta especificación, los polipéptidos ActRIIb de la divulgación demuestran eficacia biológica consistente cuando los pacientes alcanzan y mantienen una concentración sérica del polipéptido ActRIIb de por lo menos 10 µg/mL. En consecuencia, en ciertas modalidades, se puede administrar a un paciente un polipéptido ActRIIb en una pauta posológica que mantenga una concentración sérica de ActRIIb de por lo menos 8 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, o por lo menos 70 µg/mL. En ciertas modalidades, puede ser deseable mantener la concentración sérica del polipéptido ActRIIb dentro de un rango óptimo, tal como, por ejemplo, dentro de un rango de desde alrededor de 8 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL (v.g., 8-100 µg/mL, 8-70 µg/mL, 8-50 µg/mL, 8-40 µg/mL, 8-35 µg/mL, 8-30 µg/mL, 8-25 µg/mL, 8-20 µg/mL, 8-15 µg/mL, 8-12.5 µg/mL, 8-10 µg/mL, 10-100 µg/mL, 10-70 µg/mL, 10-50 µg/mL, 10-40 µg/mL, 10-35 µg/mL, 10-30 µg/mL, 10-25 µg/mL, 10-20 µg/mL, 10-15 µg/mL, 10-12.5 µg/mL, 12-100 µg/mL, 12-70 µg/mL, 12-50 µg/mL, 12-40 µg/mL, 12-35 µg/mL, 12-30 µg/mL, 12-25 µg/mL, 12-20 µg/mL, 12-15 µg/mL, 15-100 µg/mL, 15-70 µg/mL, 15-50 µg/mL, 15-40 µg/mL, 15-35 µg/mL, 15-30 µg/mL, 15-25 µg/mL, 15-20 µg/mL, 20-70 µg/mL, 20-50 µg/mL, 20-35 µg/mL, o 20-30 µg/mL).

En ciertas modalidades, pautas posológicas de la divulgación incluyen administrar un polipéptido ActRIIb en una cantidad y en un intervalo suficiente para mantener una concentración sérica de la proteína ActRIIb durante un período de tiempo deseado. La duración deseable para mantener una concentración sérica de ActRIIb deseada en un paciente dependerá del efecto biológico deseado (v.g., tratamiento de un trastorno óseo). Por ejemplo, a un paciente puede administrarse una proteína ActRIIb en una cantidad y en un intervalo suficiente para mantener la concentración sérica deseada durante el curso de alrededor de una semana a un año o más (v.g., mantener la concentración sérica deseada durante 5 días, 7 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 20 días, 25 días, 30 días, una a dos semanas, una semana a un mes, dos meses, cuatro meses, seis meses, una año, o dos años o más.) Preferiblemente, se administra a un paciente una proteína ActRIIb en una cantidad suficiente para mantener la concentración sérica deseada durante el curso de un tratamiento terapéutico. En ciertas

modalidades, la pauta posológica es suficiente para mantener la concentración sérica deseada de ActRIIb entre intervalos de dosis (v.g., entre administraciones de ActRIIb).

Como se divulga en esta especificación, los efectos biológicos de los polipéptidos ActRII pueden obtenerse con dosis de 0.3 mg/kg o más. Por consiguiente, en ciertas modalidades, un paciente puede medicarse con alrededor de 0.3 a alrededor de 15 mg/kg (e.g., 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 10.0, 12.0, o 15.0 mg/kg) de un polipéptido ActRIIb. En modalidades preferidas, se administra a un paciente por lo menos 1.0 mg/kg. Adicionalmente, los experimentos mostrados a continuación indican que la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIb-Fc está entre alrededor de 10 y 16 días. Por lo tanto, en ciertos aspectos, un paciente puede medicarse con una proteína ActRIIb de la divulgación por lo menos una vez al mes (v.g., una vez cada 5-30 días, 10-16 días, 5 días, 7 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, o 16 días; o sobre una base mensual o bimensual).

8. Composiciones Farmacéuticas

En ciertas modalidades, antagonistas ActRIIb (v.g., polipéptidos ActRIIb) de la presente invención se formulan con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIb puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden formularse para administración en cualquier forma conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

En ciertas modalidades, el método terapéutico de la invención incluye administrar la composición sistémica o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención es una forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Agentes terapéuticamente útiles, distintos de los antagonistas ActRIIb, que pueden incluirse también opcionalmente en la composición, como se describe anteriormente, pueden administrarse simultánea o consecutivamente con los compuestos en cuestión (v.g., polipéptidos ActRIIb) en los métodos de la invención.

Típicamente, los antagonistas ActRIIb se administrarán por vía parental y, particularmente, intravenosa o subcutánea. Composiciones farmacéuticas

apropiadas para administración parenteral pueden contener uno o más polipéptidos ActRIIb en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles, los cuales pueden reconstituirse en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes del uso, las cuales pueden contener antioxidantes, disoluciones amortiguadoras, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto, o agentes de suspensión y agentes espesantes. Ejemplos de portadores acuosos o no acuosos apropiados, que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención, incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilen glicol, polietilen glicol y similares) y mezclas apropiadas de los anteriores, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, con el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de dispersiones, y mediante el empleo de surfactantes.

Por lo demás, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para administración a un sitio de tejido diana (v.g., hueso o músculo). En ciertas modalidades, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de liberar uno o más compuestos terapéuticos (v.g., polipéptidos ActRIIb) a un sitio de tejido diana (v.g., hueso o músculo), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser resorbida en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRIIb. Tales matrices pueden formarse de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, la apariencia cosmética y las propiedades de la interfaz. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirá la formulación apropiada. Matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y definirse químicamente, tales como sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices se componen de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada,

vidrio bioactivo, aluminatos, u otros cerámicos. Las matrices pueden conformarse por combinaciones de cualquiera de los tipos de materiales mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Los biocerámicos pueden alterarse en composición, tales como en calcio-aluminato-fosfato, y procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas modalidades, métodos de la invención pueden administrarse oralmente, v.g., en la forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (empleando una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como un ingrediente activo. Un agente puede administrarse asimismo como un bolo, un electuario o una pasta.

En presentaciones farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención pueden mezclarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa, y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desagregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de yuca o papa, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilen glicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los anteriores; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden contener igualmente agentes reguladores. Composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse asimismo como rellenos en cápsulas de gelatina blanda o dura usando

excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilen glicoles de alto peso molecular, y similares.

Presentaciones farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las presentaciones farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en el arte, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilen glicol, 1,3-butilen glicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilen glicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los anteriores. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir asimismo coadyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y preservantes.

Suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoesterarílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol, y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los anteriores.

Las composiciones de la invención pueden contener igualmente coadyuvantes, tales como preservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. Puede ser asimismo deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Adicionalmente, la absorción prolongada de la presentación farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen posológico se determinará por el médico tratante considerando varios factores que modifican la acción de los compuestos en cuestión de la invención (v.g., antagonistas ActRIIb). Los varios factores

incluyen, pero no se limitan a, cantidad de peso de hueso que se desea formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio de daño del hueso, el estado del hueso lesionado, la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda contribuir a la pérdida ósea, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. Opcionalmente, la posología puede variar con el tipo de matriz utilizada en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final puede afectar igualmente la posología. La mejoría puede monitorearse por evaluación periódica del crecimiento óseo y/o reparación, por ejemplo, rayos X (incluyendo DEXA), determinaciones histomorfométricas, y marcación con tetraciclina.

Los experimentos mostrados a continuación demuestran que los efectos de ActRIIb-Fc en el hueso pueden lograrse con una dosis única de 1 mg/kg o más. La semivida sérica observada de la molécula está entre alrededor de 10 y 16 días. En consecuencia, puede obtenerse una concentración sérica efectiva sostenida, por ejemplo, medicando con alrededor de 0.5 a 5 mg/kg sobre una base semanal o bisemanal. Por ejemplo, dosis de 0.3, 0.5, 1, 2, 3 o 5 mg/kg, o valores intermedios, podrían usarse una vez cada 7 días, una vez cada 10 días, una vez cada 15 días, o sobre una base mensual o bimensual. Otros regímenes posológicos ejemplares se proveen anteriormente.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona asimismo una terapia génica para la producción *in vivo* de los polipéptidos ActRIIb. Tal terapia alcanzaría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias polinucleotídicas ActRIIb en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La introducción de secuencias polinucleotídicas ActRIIb puede lograrse utilizando un vector de expresión recombinante, tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la introducción terapéutica de secuencias polinucleotídicas ActRIIb se prefiere el uso de liposomas direccionados.

Varios vectores virales que pueden emplearse para terapia génica, como se enseña en esta especificación, incluyen adenovirus, herpes virus, vaccinia, o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus aviar o murino. Ejemplos de vectores retrovirales en los cuales puede insertarse un gen extraño único incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV - *Moloney murine*

leukemia virus), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV - *Harvey murine sarcoma virus*), virus del tumor mamario murino (MuMTV - *murine mammary tumor virus*) y virus del sarcoma de Rous (RSV - *Rous Sarcoma Virus*). Numerosos vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador selectivo, de manera que puedan identificarse y generarse células transducidas. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana añadiendo, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido, o una proteína. El direccionamiento preferido ("*preferred targeting*") se lleva a cabo utilizando un anticuerpo. Las personas expertas en el arte se percatarán de que secuencias polinucleotídicas específicas pueden insertarse en el genoma retroviral o añadirse a una cubierta vírica para permitir la introducción específica de la diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIb. En una modalidad preferida, el vector se direcciona al hueso o cartílago.

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

Otro sistema de transferencia direccionada ("*targeted delivery system*") para los polinucleótidos ActRIIb es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microglóbulos, y sistemas a base de lípidos incluyendo emulsiones aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas membranosas artificiales que son útiles como vehículos de transferencia *in vitro* e *in vivo*. ARN, ADN y viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y transferirse a células en una forma biológicamente activa (véase v.g., Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Métodos para transferencia génica eficiente utilizando un vehículo liposoma, son conocidos en el arte, véase v.g., Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es usualmente una combinación de fosfolípidos, por lo general en combinación con esteroides, especialmente colesterol. De igual manera pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y distearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de liposomas es también posible basándose, por ejemplo, en la especificidad de los órganos, la especificidad de las células y la especificidad de los organelos, y se conoce en el arte.

EJEMPLIFICACIÓN

Estando ahora la invención generalmente descrita, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen simplemente para efectos de ilustración de ciertas modalidades de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Proteínas de Fusión ActRIIb-Fc.

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIb soluble, que tiene el dominio extracelular del ActRIIb humano fusionado a un dominio Fc de humano o de ratón con un conector mínimo (tres aminoácidos glicina) intercalado. Los constructos se designan como ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc, respectivamente.

ActRIIb-hFc se muestra a continuación como purificado de líneas de células CHO (SEQ ID NO: 13)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Las proteínas ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc se expresaron en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

(i) melitina de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 14)

91/43

(ii) activador de plasminógeno tisular (TPA - *Tissue Plasminogen Activator*):
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 15)

(iii) Nativo: MGAAAKLAFAVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 16).

La forma seleccionada emplea el líder TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos no procesados:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

Este polipéptido se codifica por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 18):

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

El secuenciamiento N-terminal del material producido por las células CHO reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 19). Notablemente, otros constructos reportados en la literatura comienzan con una secuencia -SGR....

La purificación pudo lograrse por una serie de pasos de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier

orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación pudo completarse con una filtración viral e intercambio de disoluciones amortiguadoras ("*buffer exchange*").

Las proteínas de fusión ActRIIb-Fc se expresaron igualmente en células HEK293 y células COS. Aunque el material de todas las líneas de células y condiciones razonables de cultivo proporcionó proteína con actividad desarrolladora de músculo *in vivo*, se observó variabilidad en la potencia quizás relacionada con la selección de las líneas de células y/o condiciones de cultivo. La purificación se obtuvo como se describe más arriba en la especificación.

Ejemplo 2: Generación de Mutantes ActRIIb-Fc.

Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIb y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre el dominio ActRIIb extracelular y un dominio Fc. La fusión ActRIIb-Fc de fondo tiene la secuencia (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO:20):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP
TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

Varias mutaciones, incluyendo truncamientos N- y C-terminales, se introdujeron en la proteína ActRIIb-Fc de fondo. Basándose en los datos presentados en Ejemplo 1, se espera que estos constructos, si se expresan con un líder TPA, carecerán de la serina N-terminal. Se generaron mutaciones en el dominio extracelular ActRIIb mediante mutagénesis PCR. Luego de la PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, digerida con SfoI y AgeI y se purificaron en gel. Estos fragmentos se ligaron en un vector de expresión pAID4 (véase WO2006/012627) de manera que, luego del ligamiento, creara quimeras de fusión con IgG1 humana. Luego de la transformación en DH5 alpha de *E. coli*, se recogieron colonias y se aislaron ADNs. Para constructos murinos (mFc), una IgG2a murina se sustituyó por la IgG1 humana. Todos los mutantes se

verificaron mediante secuencia.

Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección transitoria. En resumen, en una centrifugadora ("*spinner*") de 500ml, se pusieron células HEK293T con una concentración de 6×10^5 células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250ml y se cultivaron de un día para otro. Al siguiente día, estas células se trataron con complejo ADN:PEI (1:1) con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración final de ADN. Luego de 4 hrs, se agregaron 250 ml de medio y las células se cultivaron durante 7 días. Se recogió medio acondicionado deteniendo la centrifugación ("*spinning down*") de las células, y se concentró.

Se purificaron los mutantes usando una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, columna de proteína A y se eluyeron con solución amortiguadora de glicina con pH bajo (3.0). Luego de la neutralización, éstos se dializaron contra PBS.

Del mismo modo se produjeron mutantes en células CHO por una metodología similar.

Los mutantes se examinaron en análisis de unión y/o bioanálisis descritos a continuación. En algunos casos, se realizaron análisis con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas.

Ejemplo 3. Bioanálisis para Señalización Mediada por GDF-11 y Activina.

Se empleó un análisis de gen reportero A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIb-Fc sobre la señalización por GDF-11 y activina A. Línea celular: rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector reportero: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler et al., 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Véase Figura 1. El motivo CAGA12 está presente en genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), de manera que este vector es de uso general para factores señalizadores a través de Smad2 y 3.

Día 1: Esparcir células A-204 en una placa de 48 pocillos.

Día 2: Células A-204 transfectadas con 10 μg pGL3(CAGA)12 o

pGL3(CAGA) 12(10 ug)+ pRLCMV (1 ug) y Eugene.

Día 3: Agregar factores (diluidos en medio + 0.1 % BSA). Los inhibidores necesitan preincubarse con los factores durante 1 hr antes de agregar las células. 6 hrs después, lavar las células con PBS, y lisar las células.

Esto es seguido por un análisis de luciferasa. En la ausencia de inhibidores de cualquier tipo, la activina A mostró una estimulación de 10 veces de la expresión del gen reportero y una $ED_{50} \sim 2$ ng/ml. GDF-11: estimulación de 16 veces, ED_{50} : ~ 1.5 ng/ml.

ActRIIb(R64, 20-134) es un potente inhibidor de activina, actividad GDF-8 y GDF-11 en este análisis. Las variantes se examinaron también en este análisis.

Ejemplo 4: Estudio Clínico Humano, Dosis Única Ascendente.

La proteína ActRIIb (20-134)-hFc descrita en Ejemplo 1 se administró a pacientes humanos en un estudio controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, que se condujo para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres posmenopáusicas, sanas. Se aleatorizaron 48 sujetos en seis cohortes de 8 individuos para recibir una dosis única de ActRIIb-hFc o placebo (6 activo: 2 placebo). Las concentraciones de la dosis variaban desde 0.02 a 3.0 mg/kg administrados subcutáneamente (SC). Todos los sujetos fueron monitoreados durante 57 días. Los sujetos se excluían de la participación en el estudio si tomaban medicamentos que afectaran el metabolismo óseo en un plazo de 6 meses de la entrada al estudio. Se condujeron evaluaciones de seguridad haciendo seguimiento a cada cohorte para determinar el escalamiento de la dosis. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), se evaluó también la actividad biológica de ActRIIb-hFc mediante medición de los marcadores biológicos de formación ósea y resorción, y concentraciones de FSH.

No se informaron acontecimientos adversos serios en este estudio.

Los análisis farmacocinéticos (PK) de ActRIIb-hFc exhibieron un perfil lineal con la dosis y una semivida de aproximadamente 10-16 días (véase Figura 2). El área bajo la curva (AUC - *area-under-curve*) para ActRIIb-hFc se relacionó linealmente con la dosis, y la absorción después de la dosificación SC fue

esencialmente completa. Con dosis mayores, ActRIIb-hFc causó incrementos en la masa corporal magra (LBM - *lean body mass*), como se demostró usando gammagrafías de absorciometría de rayos X de doble energía (DXA - *dual energy X-ray absorptiometry*) (véase Figura 3). El aumento medio en LBM comparada con valores de referencia fue de 2.6% (0.92 kg) en dos meses después de la dosis con 3 mg/kg. El grupo tratado con placebo disminuyó en 0.2%. Más sujetos con las dosis más elevadas (1 y 3 mg/kg) tuvieron por lo menos un aumento de 0.5 kg en LBM ya en 15 días después de la dosificación con ActRIIb-hFc, que se sostuvo hasta el día 57 cuando se compararon con el placebo y las dosis menores (véase Figura 4). En sujetos medicados con ActRIIb-hFc con 1 y 3 mg/kg, se midieron variaciones significativas dependientes de la dosis en biomarcadores séricos del metabolismo de las grasas (adiponectina incrementada y leptina disminuida) (véase Figuras 5 y 6). ActRIIb-hFc causó un aumento sostenido, dependiente de la dosis, en las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP - *bone-specific alkaline phosphatase*), la cual es un marcador para el crecimiento óseo anabólico, y una disminución dependiente de la dosis en el telopéptido de colágeno tipo 1 (CTX - *C-terminal type 1 collagen telopeptide*), que es un marcador para resorción ósea (véase Figuras 7 y 8). Las concentraciones de BSAP mostraron efectos cuasi saturantes con la máxima dosificación del medicamento, indicando que efectos semi-máximos sobre este biomarcador óseo anabólico podrían obtenerse con una dosificación de 1 mg/kg o menor. Estas variaciones del biomarcador óseo se sostuvieron durante aproximadamente 57 días con las máximas concentraciones de dosis examinadas. Hubo asimismo una disminución, dependiente de la dosis, en los niveles de FSH en el suero, consistente con la inhibición de activina (véase Figura 9).

Se observaron aumentos en el volumen muscular del muslo mediante imágenes de resonancia magnética (MRI - *magnetic resonance imaging*) en 29 días después de dosis únicas de ActRIIb-hFc con 1 y 3 mg/kg, con un incremento significativo en la dosis máxima (3 mg/kg) comparada con placebo (véase Figura 10). En particular, en 29 días después de la administración de una dosis única de 3 mg/kg de ActRIIb-hFc, se observó un incremento del 16.4% en el área muscular, un incremento del 11.5% en el volumen muscular y una disminución del 2.2% en la grasa subcutánea. La variación porcentual media de los valores de referencia en el volumen muscular del muslo en el día 29 con concentraciones de dosificación de 1 y 3 mg/kg, comparada con el placebo se muestra en Figura 11.

Una dosis única de ActRIIb-hFc administrada a mujeres posmenopáusicas sanas fue segura y bien tolerada para el rango de concentraciones de dosis analizadas. Este estudio clínico demuestra que, en humanos, ActRIIb-hFc es un agente osteoanabólico con evidencia biológica de un aumento en formación ósea y una disminución en la reabsorción ósea. ActRIIb-hFc incrementa asimismo el tamaño y la función muscular.

Ejemplo 5: Estudio Clínico Humano, Dosis Ascendentes Múltiples.

Se condujo un estudio con escalamiento de dosis, de dosis múltiple, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, para evaluar principalmente la seguridad, la tolerabilidad, los efectos farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de ActRIIb-hFc en mujeres posmenopáusicas sanas. El estudio incluía seis cohortes de 10 sujetos cada una. Los sujetos en cada cohorte se aleatorizaron para recibir ActRIIb-hFc o placebo (8 sujetos con activo y 2 sujetos con placebo por cohorte).

Las cohortes se medicaron en la siguiente forma: cohorte 1 (0.1 mg/kg), cohorte 2 (0.3 mg/kg) y cohorte 3 (1 mg/kg) recibieron ActRIIb-hFc por vía subcutánea (SC) cada 14 días para un total de 3 dosis en los días 1, 15, y 29. La cohorte 4 (1 mg/kg), cohorte 5 (2 mg/kg) y cohorte 6 (3 mg/kg) recibieron ActRIIb-hFc SC cada 28 días para un total de 2 dosis los días 1 y 29.

Se evaluaron los siguientes datos: acontecimientos adversos, exámenes de laboratorio clínico (exámenes de hematología, química, análisis de orina, función endocrina, función suprarrenal, pruebas de estimulación ACTH), signos vitales incluyendo presión sanguínea en posición supina (después de por lo menos 5 minutos) y en posición de pie (después de 2 minutos $\pm$ 30 segundos), ECG, ecocardiograma (ECHO), exámenes físicos, y anticuerpos anti-medicamentos. Farmacocinética: área bajo la curva de (AUC) la concentración ActRIIb-hFc sérica, concentración pico (C_{max}), tiempo a la concentración pico (T_{max}), semivida de eliminación ($t_{1/2}$), depuración (Cl/F) y volumen de distribución (V_z/F). Farmacodinámica: FSH, masa corporal magra medida por gammagrafías DXA de cuerpo entero, densidad mineral ósea (BMD - *bone mineral density*) medida por gammagrafías DXA de la columna lumbar, cadera y cuerpo entero, tamaño muscular medido por imágenes MRI en las cohortes 3-6, y otros marcadores de efecto farmacodinámico.

97

Como se muestra en Figura 14, concentraciones séricas de ActRIIb-hFc se relacionaron con la cantidad y frecuencia de la dosis. Notablemente, las dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg administradas cada 28 días alcanzaron concentraciones pico elevadas con concentraciones mínimas ("*troughs*") marcadas. La dosis de 1 mg/kg administrada cada 14 días alcanzó una concentración ascendente con concentraciones mínimas más pequeñas. Después de la segunda dosis, la dosis de 1 mg/kg administrada cada 14 días mantuvo una concentración sérica media en pacientes por encima de aproximadamente 12 microgramos/mL, mientras que las dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg administradas cada 28 días exhibieron concentraciones mínimas a una media de aproximadamente 8 y 10 microgramos/mL, respectivamente. Como se muestra en Figura 15, las concentraciones mínimas en concentración sérica se reflejaron en efectos sobre FSH. Se cree que la producción de FSH se estimula por activinas y, en consecuencia, se espera que el uso de un antagonista de activina tal como ActRIIb-hFc inhiba la producción de FSH. En efecto, todas las dosis de ActRIIb-hFc exhibieron alguna inhibición de FSH. Esto se muestra por los trazados que descienden debajo del eje X en Figura 15. Interesantemente, la dosis de 1 mg/kg administrada cada 14 días no exhibió disminución media en la inhibición de FSH durante el período de dosificación, mientras que las dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg administradas cada 28 días exhibieron un incremento sustancial en la producción de FSH (por lo tanto una reducción en la supresión de FSH), que correspondía a la concentración mínima en concentración sérica (a grandes rasgos, entre los días del estudio 15 y 36). Concluimos que medicar proteínas ActRIIb-hFc en una manera que permite que la concentración sérica caiga a un nivel tan bajo como 8 o 10 microgramos/mL causa una liberación transitoria en la supresión de la señalización de activina por el medicamento y, quizás, una liberación transitoria en la supresión de otros ligandos, tales como miostatina o GDF-11. Notablemente, la dosis de 1 mg/kg administrada cada 14 días pareció causar un mayor aumento en masa muscular, según se midió por la masa magra corporal total (véase Figura 16) que el logrado por las dosis menos frecuentes de 2 mg/kg y 3 mg/kg. Mientras los pacientes en el régimen de dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg administradas cada 28 días recibieron un total de 4 o 6 mg/kg de medicamento durante este estudio, los pacientes en el régimen de dosis de 1 mg/kg administrada cada 14 días recibieron un total de únicamente 3 mg/kg de medicamento durante el estudio. No obstante, la dosis menor, más frecuente, proporcionó un efecto aparente mayor sobre la masa muscular (exhibida en este estudio como una tendencia que no alcanza

98/100

significación estadística). Se espera que esta eficacia superior con una menor dosis se deba a la más sostenida supresión del ligando que ocurre con el régimen posológico más frecuente, como se muestra por los efectos sobre FSH. Como consecuencia, se espera que el régimen posológico, que mantiene una concentración sérica por encima de alrededor de 8, 10 o 12 microgramos por mL, ofrezca una eficacia óptima para los medicamentos basados en el modo de acción de ActRIIb-hFc. Esta conclusión debe ser aplicable a una amplia gama de proteínas ActRIIb-hFc, independientemente de la semivida sérica, siempre y cuando tales proteínas tengan una afinidad para activinas y miostatina/GDF-11 que está en el mismo rango que para ActRIIb-hFc silvestre.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta especificación se incorporan aquí por referencia en su integridad, como si específica e individualmente se indicara que cada publicación o patente individual se incorpora por referencia.

Aunque las modalidades específicas del asunto en cuestión se han discutido, la anterior especificación es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes a los expertos en el arte luego de la revisión de esta especificación y las siguientes reivindicaciones. El ámbito completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones, junto con su completo alcance de equivalentes, y la especificación, junto con tales variaciones.

Reivindicamos:

1. Un método para medicar a un paciente con una proteína de fusión ActRIIb-Fc, método que incluye administrar una proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente en un régimen posológico que mantiene una concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc de por lo menos 8 µg/mL.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc se mantiene en una concentración de por lo menos 10 µg/mL.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc se mantiene en una concentración de por lo menos 12 µg/mL.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc se mantiene en una concentración de por lo menos 20 µg/mL.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración sérica de la proteína de fusión ActRIIb-Fc se mantiene en una concentración de entre 8-70 µg/mL.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la pauta posológica implica administrar por lo menos 0.3-5 mg/kg de la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la pauta posológica implica administrar por lo menos 1-3 mg/kg de la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la pauta posológica implica administrar 1 mg/kg de la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la pauta posológica implica administrar la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente una vez cada 5 a 30 días.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la pauta posológica implica administrar la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente una vez cada 10-16 días.

100/100

11. El método de la reivindicación 10, en donde la pauta posológica implica administrar la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente una vez cada 14 días.
12. El método de la reivindicación 1, en donde la pauta posológica implica administrar 1 mg/kg de la proteína de fusión ActRIIb-Fc al paciente una vez cada 14 días.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente está necesitado de mayor crecimiento óseo, mayor densidad ósea o mayor resistencia ósea.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el paciente está sufriendo de un trastorno relacionado con los huesos.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente tiene cáncer.
16. El método de la reivindicación 15, en donde el paciente tiene cáncer de mama.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente está sufriendo de un trastorno asociado con pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc se selecciona del grupo conformado por:
 - a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEQ ID NO:2, 3 o 13;
 - b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a SEQ ID NO:2, 3 o 13;
 - c) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 3 o 13;
 - d) un polipéptido que incluye por lo menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2; y
 - e) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos

101/103

90% idéntica a una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:1;

f) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:1; y

g) un polipéptido que incluye una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:1.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc tiene una o más de las siguientes características:

se une a un ligando ActRIIb con una K_D de por lo menos 10^{-7} M; e

inhibe la señalización ActRIIb en una célula.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la citada proteína de fusión ActRIIb-Fc incluye uno o más residuos de aminoácido modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una fracción lipídica, y un aminoácido conjugado a un agente orgánico de derivación.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

22. El método de la reivindicación 21, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la

102/104

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

23. El método de la reivindicación 22, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

24. El método de la reivindicación 23, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc tiene una semivida sérica de entre 10 y 16 días en humanos sanos, normales.

26. Un método para medicar a un paciente con una proteína de fusión ActRIIb-Fc, método que incluye medicar el paciente con 0.3 a 5 mg/kg de ActRIIb-Fc una vez cada 5 a 30 días.

27. El método de la reivindicación 26, en donde el paciente se medica con 1-3 mg/kg de ActRIIb.

28. El método de la reivindicación 26-27, en donde el paciente se medica con ActRIIb cada 10-16 días.

29. El método de la reivindicacións 26-28, en donde el paciente está necesitado de mayor crecimiento óseo, mayor densidad ósea o mayor resistencia ósea.

30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-29, en donde el paciente está sufriendo de un trastorno relacionado con los huesos.

31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde el paciente tiene cáncer.

32. El método de la reivindicación 31, en donde el paciente tiene cáncer de mama.

33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde el paciente está sufriendo de un trastorno asociado con pérdida muscular o crecimiento muscular insuficiente.

34. Un método para (i) promover el crecimiento óseo anabólico, o (ii) tratar un tumor óseo, método que incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una proteína de fusión ActRIIb-Fc.

35. El método de la reivindicación 34, en donde el paciente está sufriendo de mieloma múltiple.

36. El método de la reivindicación 34, en donde el paciente está sufriendo de un cáncer que ha hecho metástasis al hueso.

37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-36, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc se selecciona del grupo conformado por:

un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEQ ID NO:2, 3 o 13;

un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a SEQ ID NO:2, 3 o 13;

un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 3 o 13;

un polipéptido que incluye por lo menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2;

un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:1;

un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:1; y

un polipéptido que incluye una porción de ActRIIb, en donde el extremo N-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 19-25 de SEQ ID NO:1 y el extremo C-terminal corresponde a un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID

NO:1.

38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-37, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc tiene una o más de las siguientes características:

se une a un ligando ActRIIb con una K_D de por lo menos 10^{-7} M; e

inhibe la señalización ActRIIb en una célula.

39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-38, en donde la citada proteína de fusión ActRIIb-Fc incluye uno o más residuos de aminoácido modificados, seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una fracción lipídica, y un aminoácido conjugado a un agente orgánico de derivación.

40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-39, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

41. El método de la reivindicación 40, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

42. El método de la reivindicación 41, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

43. El método de la reivindicación 42, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-43, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc tiene una semivida sérica de entre 10 y 16 días en humanos sanos, normales.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-44, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc se administra al paciente no más frecuentemente que una vez por semana.

46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-45, en donde la

105

proteína de fusión ActRIIb-Fc se administra al paciente no más frecuentemente que una vez cada dos semanas.

47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-46, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc se administra al paciente cada 10-16 días.

48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-47, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc se administra al paciente cada 10 días.

49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-48, en donde la proteína de fusión ActRIIb-Fc inhibe la resorción ósea.

50. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-49, en donde el paciente recibe además un agente anti-resorción.

51. El método de la reivindicación 50, en donde el agente anti-resorción es un agente bisfosfonato.

52. El método de la reivindicación 50, en donde el agente anti-resorción es un antagonista de ligando RANK o antagonista de osteoprotegrina.

106 108

RESUMEN

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona composiciones y métodos para promover el crecimiento óseo e incrementar la densidad ósea, así como para el tratamiento de mieloma múltiple. Se proveen también métodos para medicar a un paciente con un antagonista ActRIIb.

108
~~110~~

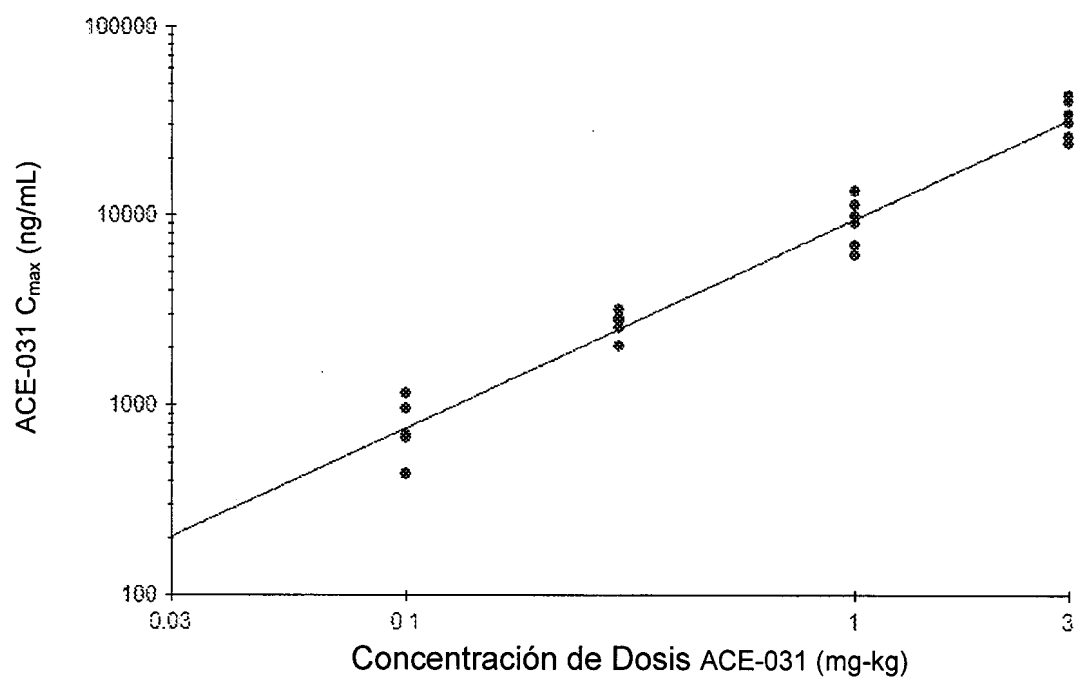


Figura 2

109

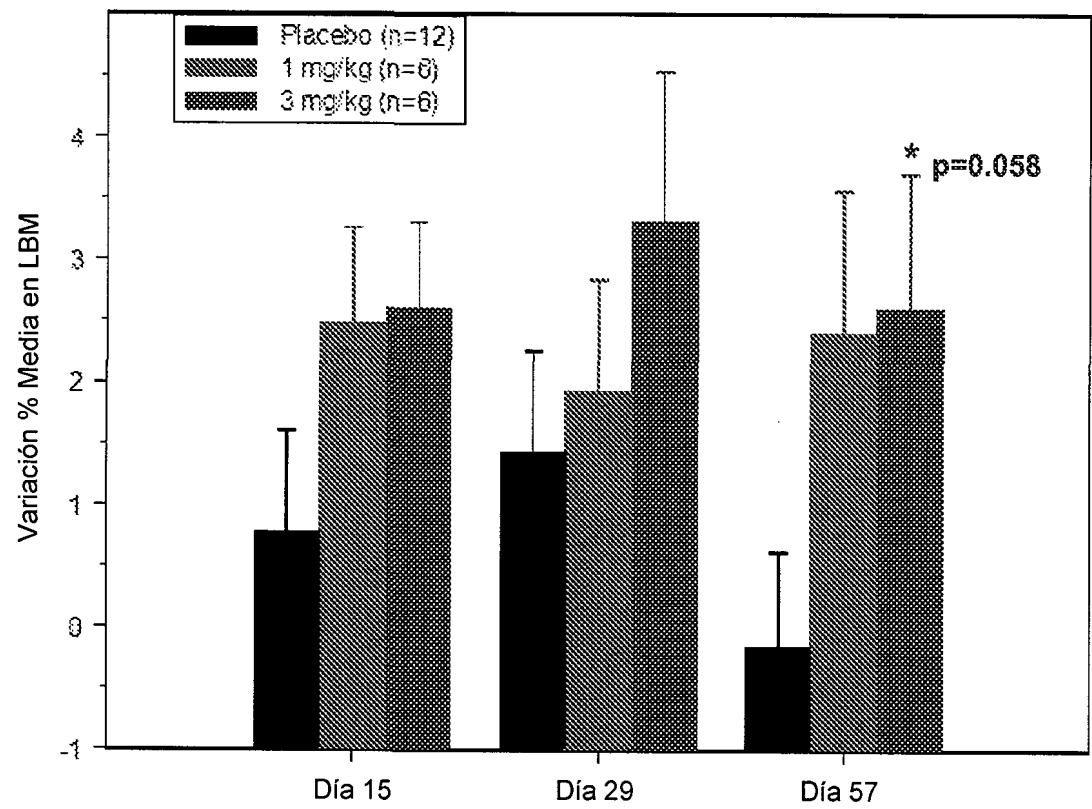


Figura 3

110
112

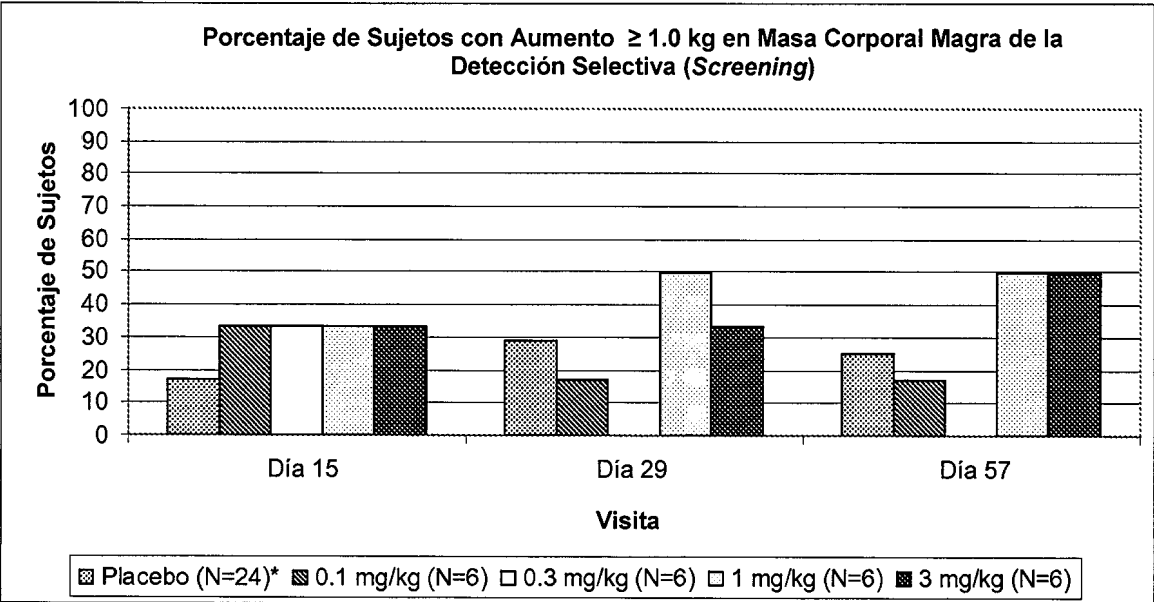
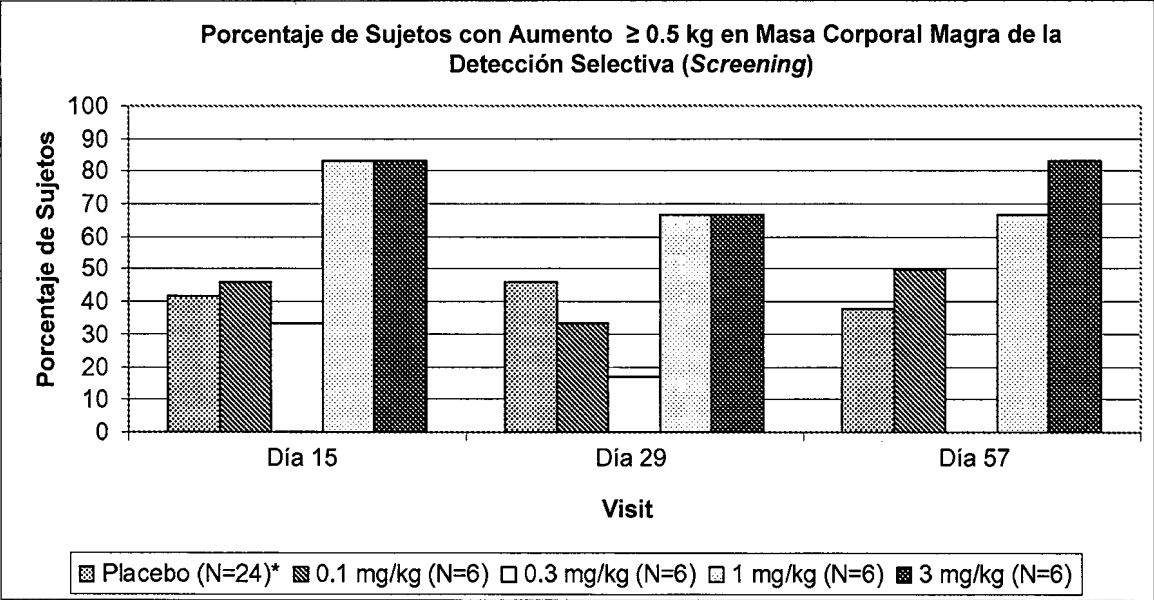


Figura 4

111
115

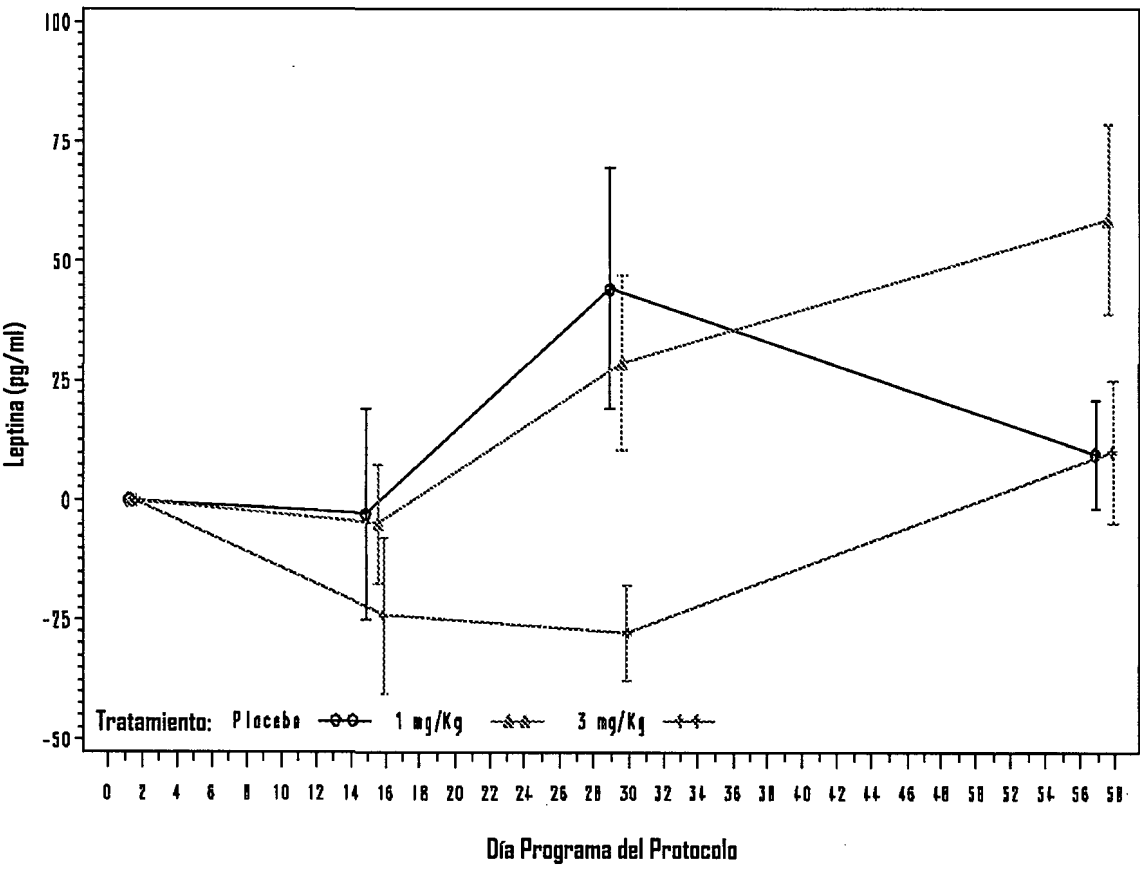


Figura 5

112/119

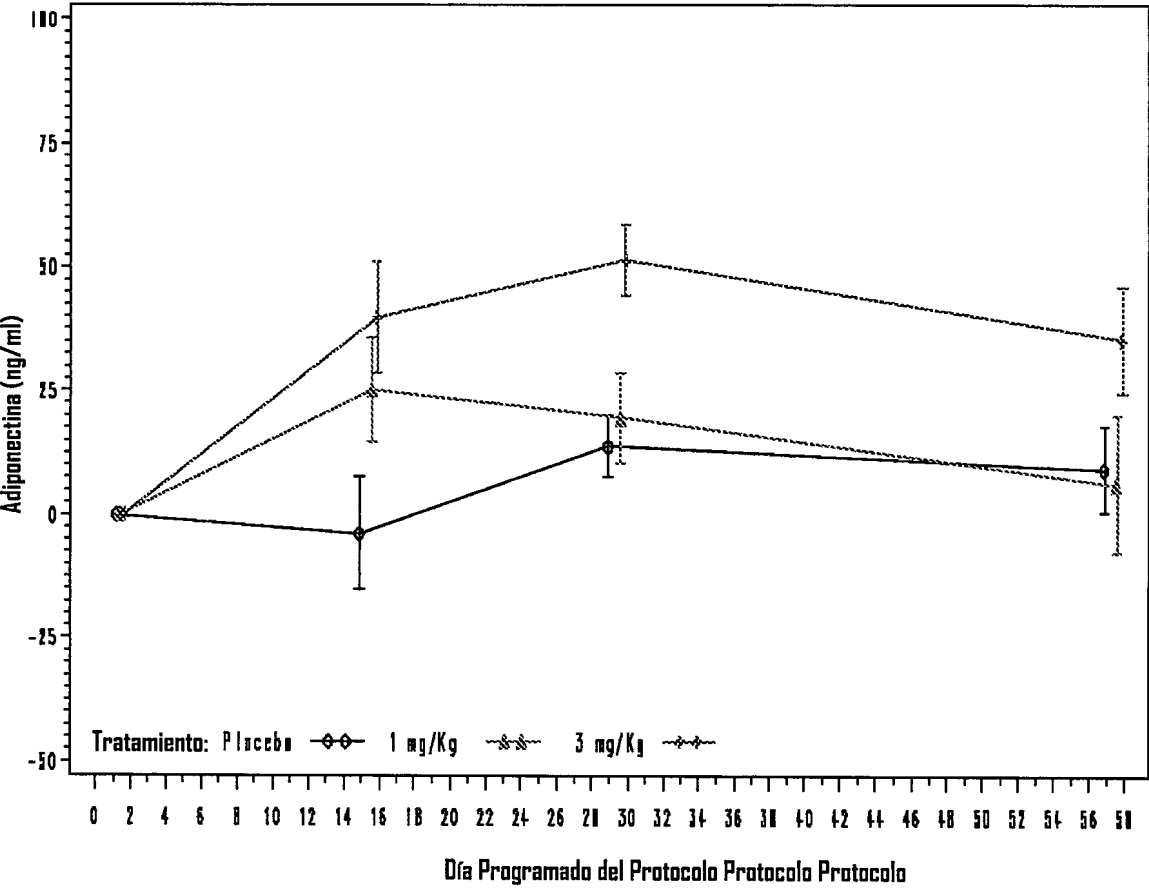


Figura 6

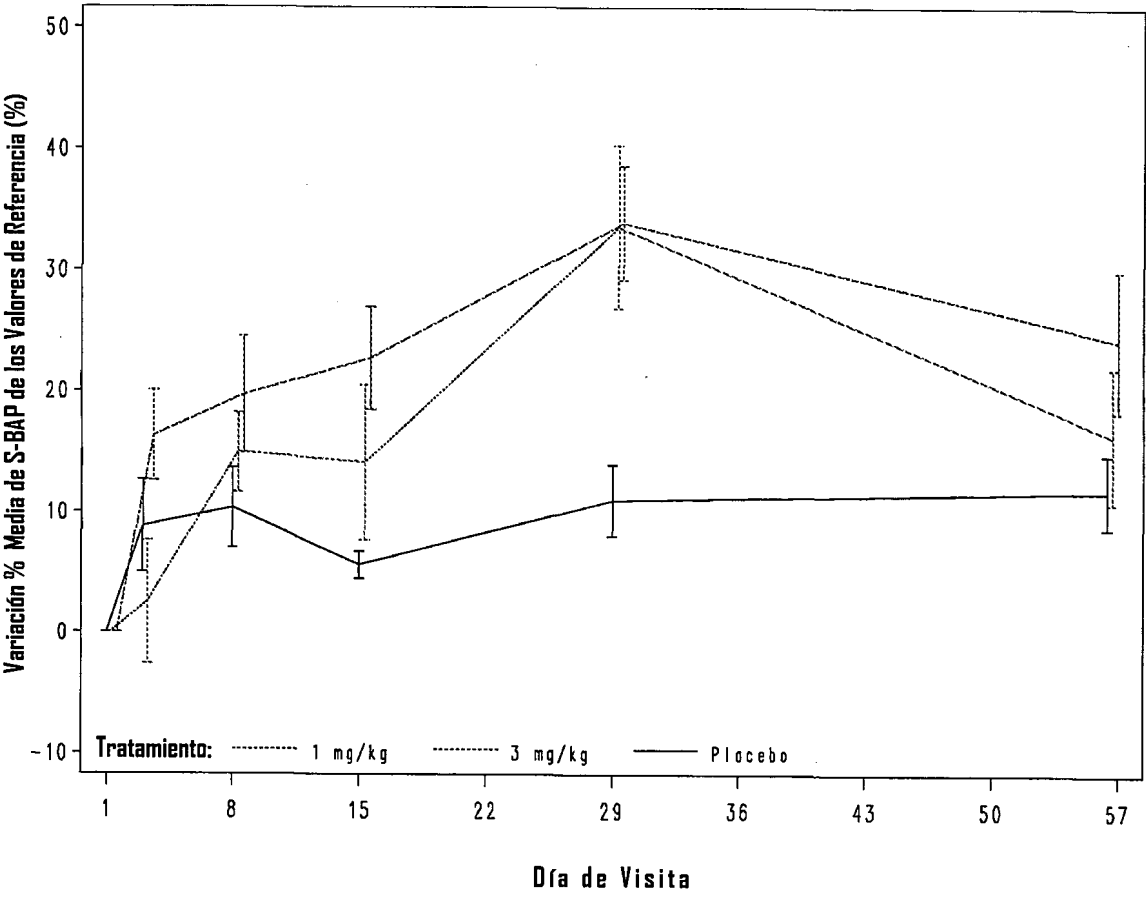


Figura 7

114 #6

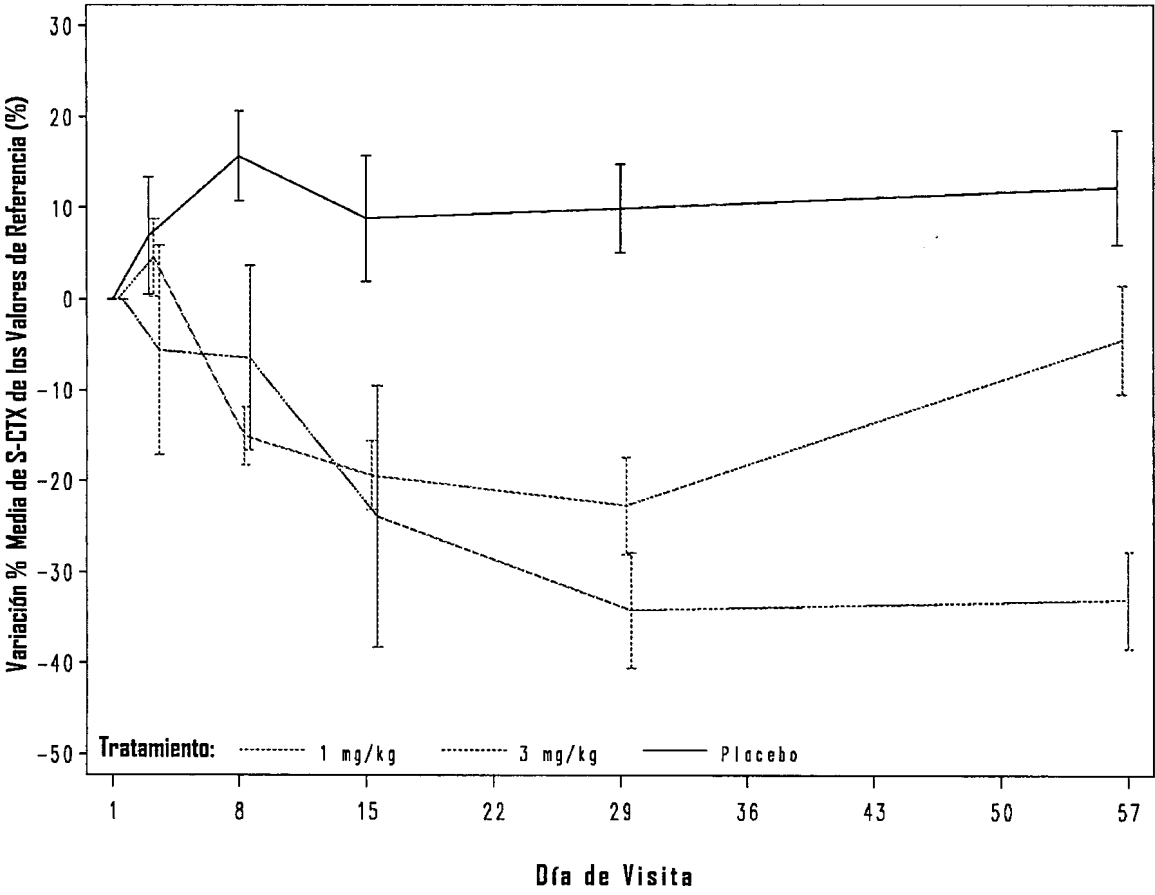


Figura 8

115
167

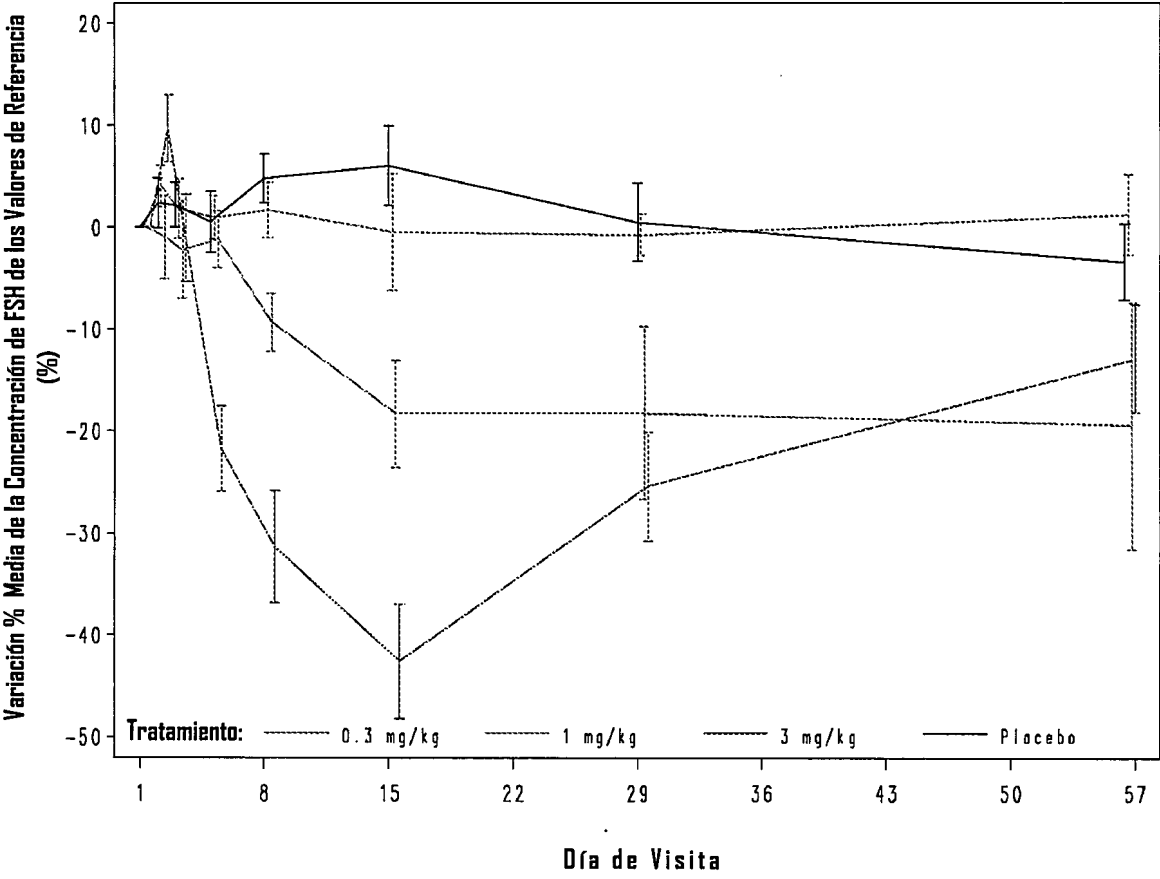


Figura 9

116 ~~118~~

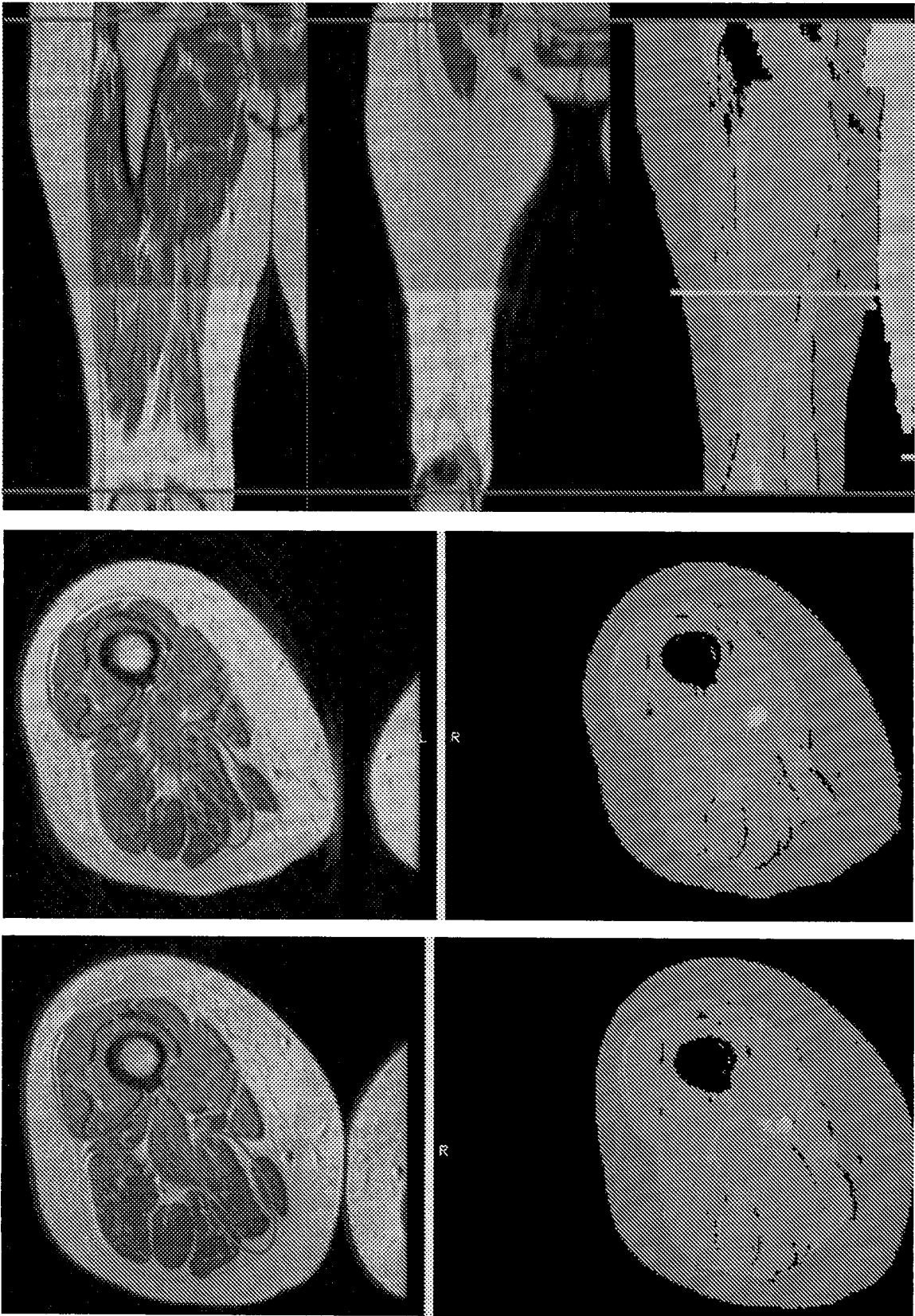


Figura 10

(17) ~~44~~

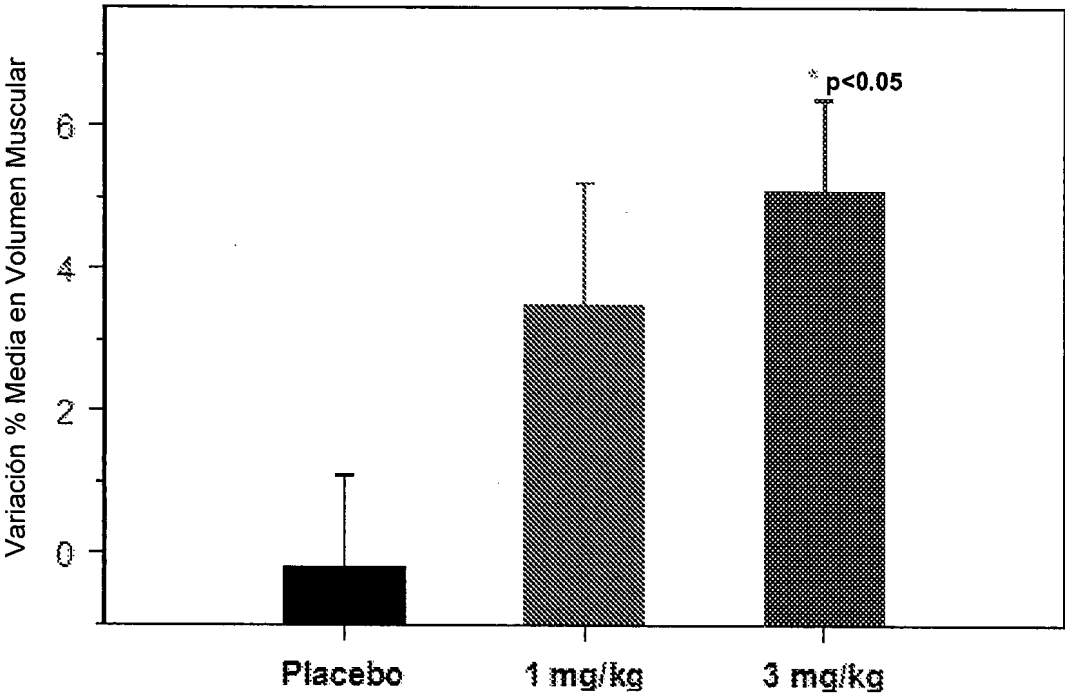


Figura 11

118/19

ActRIIB (residuos 1-134 de SEQ ID NO 1 (precursora) y SEQ ID NO: 2(extracelular))

1-134 de SEQ 1
SEQ 2

102030405060

MTAPWVALALLWGS~~L~~WPGSGRGEAETRECIYYNANWELE~~R~~TNQSGLERCEGEQDKRLHCY 60

-----GRGEAETRECIYYNANWELE~~R~~TNQSGLERCEGEQDKRLHCY 41

111213141

1-134 de SEQ 1
SEQ 2

708090100110120

ASWANSSGTIELVKKGCWLD~~D~~FN~~C~~YDRQEGVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG 120

ASWANSSGTIELVKKGCWLD~~D~~FN~~C~~YDRQEGVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG 101

5161718191101

1-134 de SEQ 1
SEQ 2

130

GPEVTYEPPPTAPT 134

GPEVTYEPPPTAPT 115

111

Figura 12

119

ActRIIa ILGRSETQEC IEFNANWEKD RINQIGVEPC YGDKDKRRC IATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKQGQWL DDINCYLRTD CVEKKDSFEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPDM
IELVKKGQWL DDFNICYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERETHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT
GGPEVTYEPP PTAPT

Figura 13

120/172

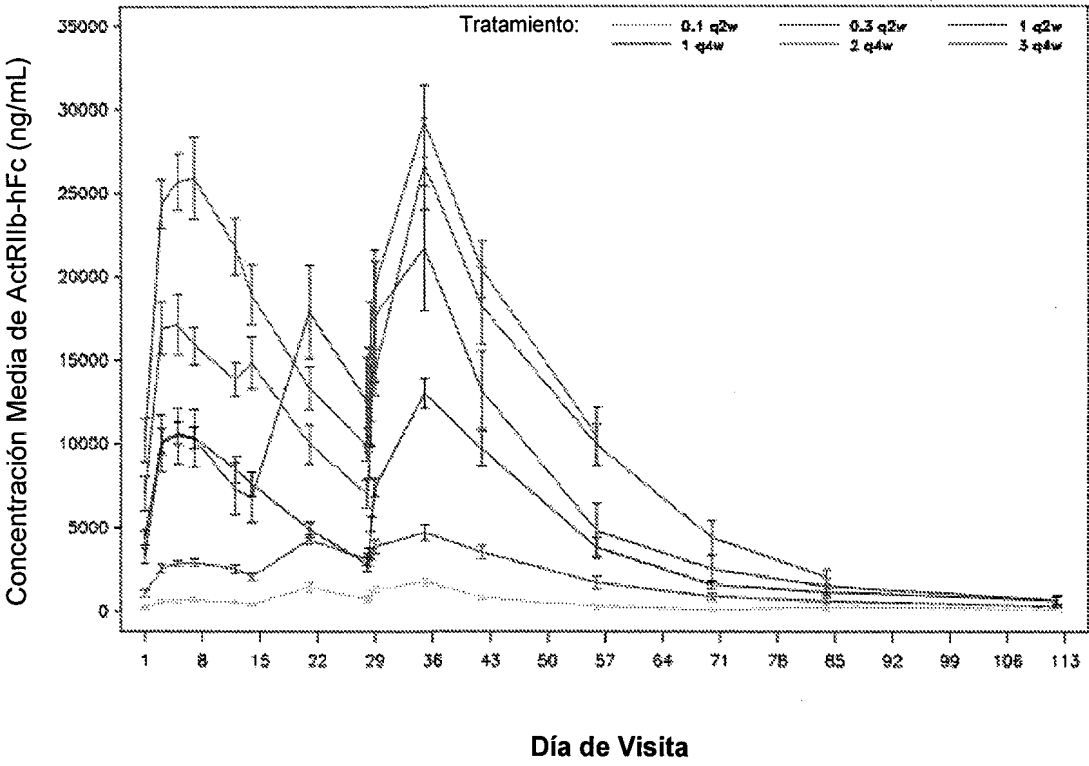


Figura 14

121/123

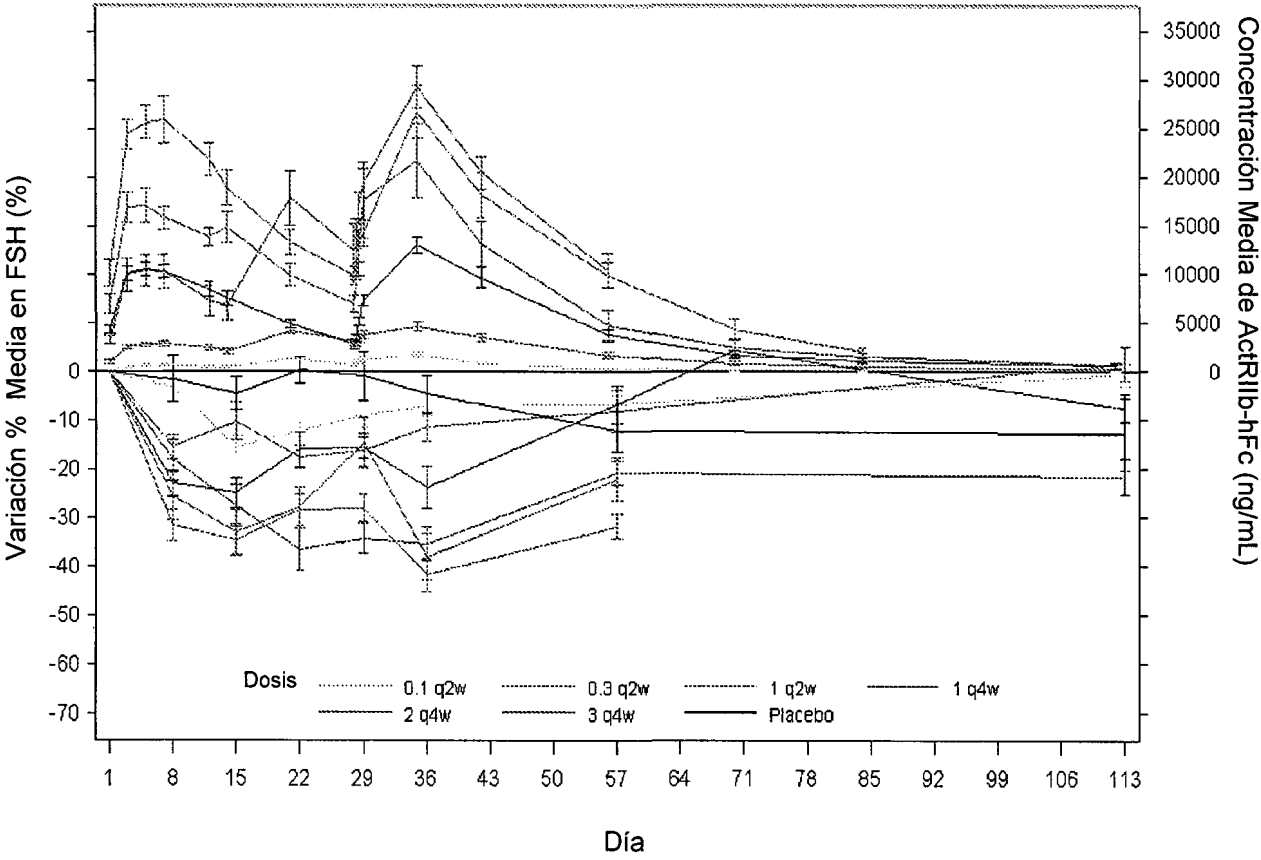


Figura 15

122/24

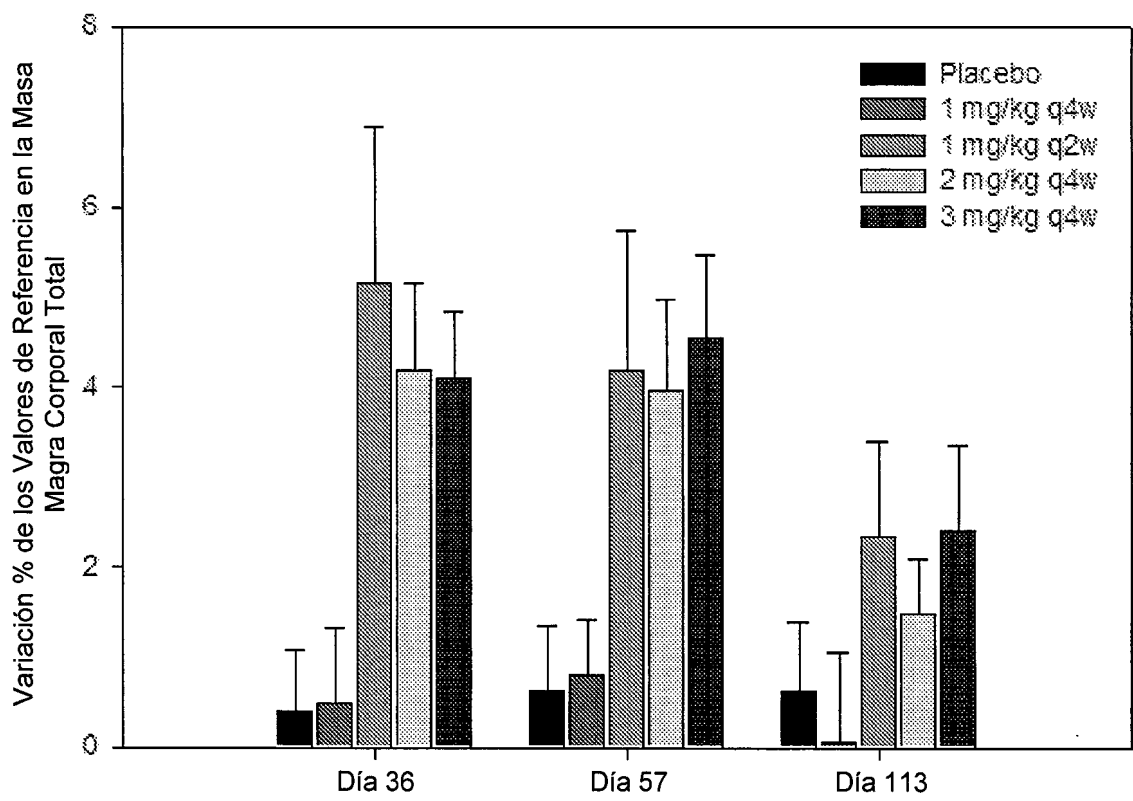


Figura 16

123/15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/048322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61P 19/08 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01) A61P 21/00 (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) EPODOC, WPI, MEDLINE, GENOMEQUEST. Keywords: Activin receptor II, ActRIIb, ACVR2B, bone, muscle, cancer. Also SEQ ID Nos 1-3 and 13.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/076437 A2 (ACCELERON PHARMA INC.) 26 June 2008. SEQ ID No 21, example 6 and claims	1-12 and 18-25.
X	WO 2004/039948 A2 (WYETH) 13 May 2004 [0126], [0071], [0074]-[0075], SEQ ID No 3 and claims	1-52
X	WO 2006/012627 A2 (ACCELERON PHARMA INC) 2 February 2006 see claims	34-43
P, X	WO 2009/158025 A2 (ACCELERON PHARMA INC) published 30 December 2009 having a priority date of 26 June 2008. Whole document	1-9, 13-27, 29-49
☐ 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 December 2010 8 December 2010 10 December 2010		Date of mailing of the international search report 15 DEC 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 Johanna Lowery AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2968

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/048322

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 2008076437		AU	2007334333	CA	2672758	CN	101687015
		EA	200970603	EC	SP099514	EP	2124999
		KR	20090096517	MX	2009006651	US	2009047281
		US	2009163417	US	2010028331	US	2010028332
		US	2010204092	WO	2009158015	WO	2009158033
WO 2004039948		AU	2003279817	BR	0315645	CA	2501180
		EP	1572961	JP	2010138179	MX	PA05004224
		US	2004223966	US	2008089897	US	2009087375
		US	2009087433				
WO 2006012627		AU	2005266875	CA	2574777	EP	1771470
		US	2006068468	US	7709605	US	2010267133
WO 2009158025		US	2010008918	US	2010015144	WO	2009158035
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. END OF ANNEX							

125

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2010/048322

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VARMA, Anita
Ropes & Gray LLP
Prudential Tower
800 Boylston Street
Boston, MA 02199-3600
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 11 April 2011 (11.04.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PHPH-053-WO1	
International application No. PCT/US2010/048322	International filing date (day/month/year) 09 September 2010 (09.09.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ATTIE, Ken	State of Nationality	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☒ the nationality ☐ the residence

Name and Address ATTIE, KEN 228 Marlborough Street Boston, MA 02116 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Roslik-Milliquet Ana
Facsimile No. +41 22 338 87 20	e-mail pt03.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 03

Figure 16

SOBRE CON
ARTE

128

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0029291

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2012 - 17:18:08

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	185803214	23/03/2012	75.635.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
=====				

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-056563- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 11:44:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

Fecha: 2012-04-04 11:44:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

P.O. 19033 - 841 - 003 - 7

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

Marzo 23 de 2012 - 17:18:26

129

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0027367

Bogotá D.C., Marzo 20 de 2012 - 07:28:36

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	185803251	16/03/2012	31.650.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1614 TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANTENIMINETO DE PATENTE D	960.000.00	960.000.00
				\$960.000.00

SON: **NOVECIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-056563- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 11:44:10

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 130

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 132

0101. 19033- 841- 003-7

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

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

Marzo 20 de 2012 - 07:28:43

130

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

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0029258

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2012 - 17:18:08

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	185803214	23/03/2012	75.635.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL	300.000.00	300.000.00
				\$300.000.00

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-056563- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 11:44:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Colo: 19033-841-003-7

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

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

Marzo 23 de 2012 - 17:18:25



No. 12-056563- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 11:44:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIAPATENTE 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 ☐