



CSA220362

Industria y Comercio

SUPERINTENDE



BT

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-55106

EXPEDIENTE No.

TÍTULO "ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRIIA
Y USOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO
ÓSEO"

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 38/12

SOLICITANTE ACCELERON PHARMA, INC.

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

PODERADO HUMBERTO TUBIO CANACHO
COD. 4134

BOGOTÁ, D. C., 30 DE MAYO 2008

CS



No. 08-055106-00000-0000

Fecha: 2008-05-30 10:53:26 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 136

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

23 mayo 2008

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre: **ACCELERON PHARMA INC.**
Dirección: **24 Emily Street,**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
Domicilio: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02139, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
Lugar de constitución: **CAMBRIDGE, MA 02139, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y 1- **John KNOFF**
Dirección: **147 Robbins Drive,**
CARLISLE, MASSACHUSETTS 01741, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.
2- **Jasbir SEEHRA**
3 Lincoln Terrace,
LEXINGTON, MASSACHUSETTS 02421-6818, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

PCT (86)
Solicitud Internacional No. **PCT/US2006/045322** Fecha **22 DE NOVIEMBRE DE 2006**
Publicación Internacional No. **WO 2007/062188** Fecha **31 DE MAYO DE 2007**

TÍTULO (54) **"ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRIIA Y USOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO ÓSEO"**

Clasificación Internacional (51) _____

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	23 DE NOVIEMBRE DE 2006	60/739,462
	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	17 DE MARZO DE 2006	60/783,322
	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	15 DE SEPTIEMBRE DE 2006	60/844,855

Comprobante de pago No. **08-39,562**

Fecha: **19 DE MAYO DE 2008**

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **ACCELERON PHARMA INC.**
(30) PRIORIDAD: **ESTADOUNIDENSE**
(31) No. DE SOLICITUD: 60/739,462 (72) INVENTORES: John KNOPF
60/783,322 Jasbir SEEHRA
60/844,855
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23 DE NOVIEMBRE DE 2.005
17 DE MARZO DE 2006
15 DE SEPTIEMBRE DE 2006
(33) PAÍS: **Estados Unidos de América** (74) APODERADO: **HUMBERTO RUBIO CAMCHO**

Solicitud Internacional No. **PCT/US2006/045322** Fecha **22 DE NOVIEMBRE DE 2006**
Publicación Internacional No. **WO 2007/062188** Fecha **31 DE MAYO DE 2.007**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRIIA Y USOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO ÓSEO

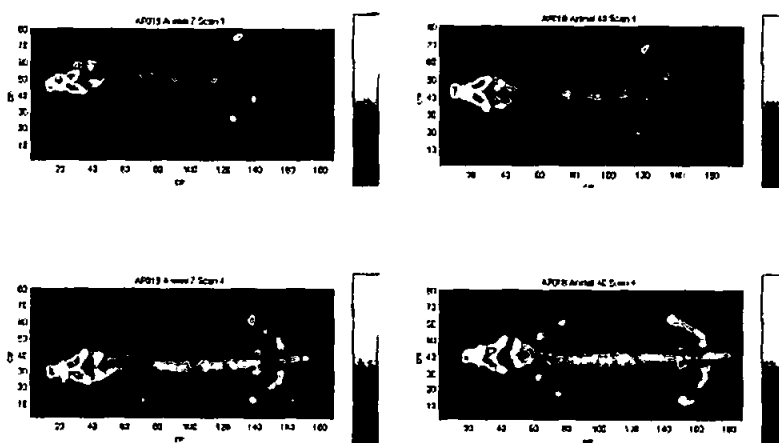
RESUMEN:

Un polipéptido ActRlla que se une a activina que tiene una secuencia de aminoácidos consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7.

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
Poderes, si fuere el caso.
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
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.
- X Arte final 12 x 12
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.
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros - *opinión escrita emitida por la Autoridad encargada de la búsqueda internacional - Informe preliminar Int Cap I.*

Figura característica:



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

[Handwritten signature]

C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de la Judicatura

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 39,562
FECHA : MAYO 19 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055106- -00000-0000

Fecha: 2008-05-30 10:53:26 Dep: 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 136

***** CONSIGNACION *****

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA AROGCONSIGNACION		BANCO DE BOGOTA	062754387	3255755	19/05/2008	1,599,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 May 2007 (31.05.2007)

(10) International Publication Number
WO 2007/062188 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/435 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/045322

(22) International Filing Date:
22 November 2006 (22.11.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/739,462 23 November 2005 (23.11.2005) US
60/783,322 17 March 2006 (17.03.2006) US
60/844,855 15 September 2006 (15.09.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AC-
CELERON PHARMA INC. [—/US]; 24 Emily Street,
Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

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

(74) Agents: VINCENT, Matthew, P. et al.; FISH & NEAVE
IP GROUP, ROPES & GRAY LLP, One International
Place, Boston, MA 02110-2624 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

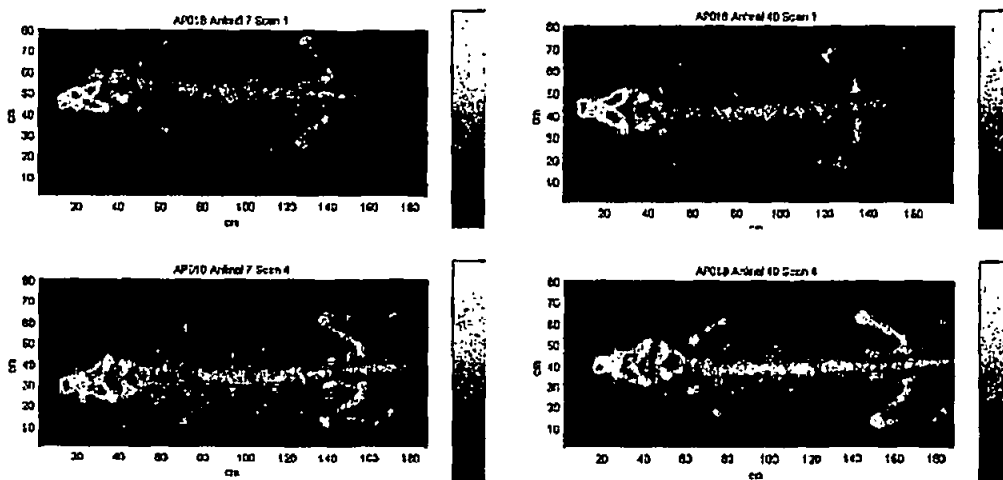
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ACTIVIN-ACTRIA ANTAGONISTS AND USES FOR PROMOTING BONE GROWTH



(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for promoting bone growth and increas-
ing bone density.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 May 2007 (31.05.2007)

(10) International Publication Number
WO 2007/062188 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/17 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/045322

(22) International Filing Date:
22 November 2006 (22.11.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/739,462 23 November 2005 (23.11.2005) US
60/783,322 17 March 2006 (17.03.2006) US
60/844,855 15 September 2006 (15.09.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AC-
CELERON PHARMA INC. [—/US]; 24 Emily Street,
Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

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

(74) Agents: VINCENT, Matthew, P. et al.; FISH & NEAVE
IP GROUP, ROPES & GRAY LLP, One International
Place, Boston, MA 02110-2624 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PI, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

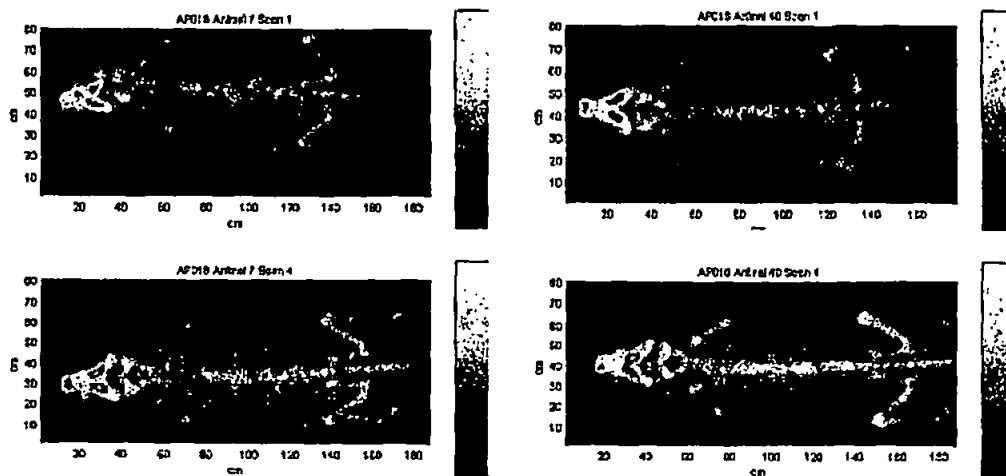
Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
13 September 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONISTS AND USES FOR PROMOTING BONE GROWTH



(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for promoting bone growth and increas-
ing bone density.

WO 2007/062188 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/045322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17 C07K14/705 C12N5/10

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)

A61K C07K C12N

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, FSTA, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/094871 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOPF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 13 October 2005 (2005-10-13) the whole document, in particular p.2, last paragraph; p. 8, 2nd paragraph; Example 3 and claims, especially claims 1, 14 and 15	18,19, 21-37, 49,52,53
X	WO 2005/028517 A (GEN HOSPITAL CORP [US]; LIN HERBERT Y [US]; DEL RE ELISABETTA [US]; SC) 31 March 2005 (2005-03-31) the whole document, in particular [0022], [0088]-[0098],[0150]-[0160] and claims	18,19, 21-37, 49,52,53
P,X	WO 2006/012627 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOPF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 2 February 2006 (2006-02-02) the whole document	1-54
-/--		

☒ 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 document 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

I 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.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2007

Date of mailing of the international search report

05/07/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Basslas, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/045322

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/097825 A (XENCOR INC [US]; DESJARLAIS JOHN R [US]; MARSHALL SHANNON ALICIA [US];) 20 October 2005 (2005-10-20) see the whole document, in particular Fig. 3 and SEQ ID NO: 10 -----	
A	US 6 093 547 A (JIN DONALD F [US] ET AL) 25 July 2000 (2000-07-25) the whole document, in particular Example 1 and columns 43-48 -----	
A	WO 2004/039948 A (WYETH CORP [US]; WOLFMAN NEIL M [US]; BOUXSEIN MARY L [US]) 13 May 2004 (2004-05-13) -----	
A	HARRISON C A ET AL: "Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications" TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 2, March 2005 (2005-03), pages 73-78, XP004768099 ISSN: 1043-2760 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/045322

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 13-28, 32-36 and 38- 47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/045322

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2005094871	A	13-10-2005	AU	2005229072 A1		13-10-2005
			CA	2561317 A1		13-10-2005
			EP	1732589 A2		20-12-2006
WO 2005028517	A	31-03-2005	NONE			
WO 2006012627	A	02-02-2006	AU	2005266875 A1		02-02-2006
			CA	2574777 A1		02-02-2006
			EP	1771470 A2		11-04-2007
WO 2005097825	A	20-10-2005	AU	2005230854 A1		20-10-2005
			CA	2561809 A1		20-10-2005
			EP	1730186 A2		13-12-2006
US 6093547	A	25-07-2000	US	5861479 A		19-01-1999
WO 2004039948	A	13-05-2004	AU	2003279817 A1		25-05-2004
			BR	0315645 A		30-08-2005
			CA	2501180 A1		13-05-2004
			EP	1572961 A2		14-09-2005
			JP	2006516886 T		13-07-2006
			MX	PA05004224 A		20-09-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

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

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference PHPH-PWO-019	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2006/045322	International filing date (<i>day/month/year</i>) 22 November 2006 (22.11.2006)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 23 November 2005 (23.11.2005)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant ACCELERON PHARMA INC.			

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a). 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.																
3. This report contains indications relating to the following items: <table border="0"> <tr> <td>☒ Box No. I</td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table> 4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).	☒ Box No. I	Basis of the report	☒ Box No. II	Priority	☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☒ Box No. VI	Certain documents cited	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the report															
☒ Box No. II	Priority															
☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability															
☐ Box No. IV	Lack of unity of invention															
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement															
☒ Box No. VI	Certain documents cited															
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application															
☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application															

	Date of issuance of this report 27 May 2008 (27.05.2008)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt03.pct@wipo.int

Form PCT/IB/373 (January 2004)

INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/045322

International filing date (day/month/year)
22.11.2005

Priority date (day/month/year)
23.11.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K38/17 C07K14/705 C12N5/10

Applicant
ACCELERON PHARMA INC.

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

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

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1b(5b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel: +49 89 2339-0 Tx: 523658 epmu d
Fax: +49 89 2339-4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bassias, Ioannis

Telephone No. +49 89 2339-5106



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/045322

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:
see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/045322

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial
applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 13-28,32-36,38-47

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 13-28,32-36,38-47 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/045322

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-17,20,38-48,50,51,54</u>
	No: Claims	<u>18,19,21-37,49,52,53</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-17,20,38-48,50,51,54</u>
	No: Claims	<u>18,19,21-37,49,52,53</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-12,29-31,37,48-54</u>
	No: Claims	:

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Re Item II

1. It appears that the priority is validly claimed.

Re Item III

1. For the assessment of the present claims 13-28, 32-36, and 38-47 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item V and VIII

1. The present application relates to activin-binding ActRIIa polypeptides, ActRIIa-Fc fusion proteins and the use of antagonists of said molecules for treating bone-related disorders.
2. Reference is made to the following documents (the document numbering corresponds to their order of citation in the International Search Report):

D1: WO 2005/094871 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOPF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 13 October 2005 (2005-10-13)
D2: WO 2005/028517 A (GEN HOSPITAL CORP [US]; LIN HERBERT Y [US]; DEL RE ELISABETTA [US]; SC) 31 March 2005 (2005-03-31)
D4: WO 2005/097825 A (XENCOR INC [US]; DESJARLAIS JOHN R [US]; MARSHALL SHANNON ALICIA [US];) 20 October 2005 (2005-10-20)
D5: US-A-6 093 547 (JIN DONALD F [US] ET AL) 25 July 2000 (2000-07-25)
3. Claims 1-12 restricted to the ActRIIa-hFc fusion protein having the sequence as

shown in SEQ ID NO: 7 (and its corresponding DNA as shown in SEQ ID NO: 14) appear neither to be known in the description nor to be suggested. Hence, said claims appear to meet the requirements of Article 33(2) and (3) PCT.

4. Claims 13-17 directed to methods for promoting bone growth under the use of specific polypeptides (SEQ ID NOs: 2 and/or 3) appear also to be in accordance with Article 33(2) and (3) PCT.
D4 and/or D5 disclose polypeptides having the requested amino acid sequence identity however, lacking the teaching of the use of said molecules for the claimed method to promote bone growth, increase bone density etc.
Hence, methods restricted to the specific molecules appear to be novel and inventive.
5. However, there are also claims which are not restricted to specific molecules but which refer to any antagonists. Such claims are anticipated by any prior art referring to any kind of antagonists of activin or ActRIIa.
D1 and D2 are two examples for such conflicting prior art. D1 describes BMP-3 propeptides which inhibit the interaction between mature BMP-3 and ActRIIa and thus inhibit the signaling. BMP-3 bind to ActRIIa and are used for promoting bone-growth and/or inhibiting bone-loss. The BMP-3 propeptides can thus be considered as antagonists of ActRIIa since they compete with BMP-3 and can be used for bone-related disease treatment.
D2 discloses a complex between a TGF-beta type III receptor and a soluble activin type II or type IIB receptor which can be used for treating different disorders, inter alia bone disorders.
Inhibin and betaglycans described therein can also be considered as antagonists of activin or its receptor.
Hence, due their breadth all claims not being restricted to specific molecules, namely claims 18, 19, 21-37, 49, 52 and 53 do not meet the requirements of Article 33(2) and (3) PCT in view of any prior art referring to any kind of antagonists of activin or ActRIIa, as described e.g. in D1 and/or D2.
6. It has furthermore to be noted that expressions like agonists and antagonists could lack clarity (Article 6 PCT). Such compounds should be defined by structural features, not by their activity (note that e.g., sulfuric acid is a very strong antagonist of all

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/045322

polypeptides.

7. The expression "second bone-active agent" used e.g. in claims 27 or 29 is not clear in the sense of Article 6 PCT.
8. Claim 11 referring to human cells could possibly embrace subject-matter like human germ cells, human embryonic stem cells, etc. which would cause problems under e.g. Rule 23d EPC in the European phase.
9. Expressions like "incorporated herein by reference" used throughout the whole description render the true scope of the application unclear and are thus not in accordance with Article 6 PCT.

Re Item VI

1. The following document(s) may become relevant in the European phase under Article 54(3) and (4) EPC:

D3: WO 2006/012627 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOPF JOHN [US];
SEEHRA JASBIR [US]) 2 February 2006 (2006-02-02)

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

**ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRIIA Y USOS
PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO ÓSEO**

SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes Provisionales EE.UU. N° 60/739.462, depositada el 23 de Noviembre de 2005, 60/783.322, depositada el 17 de Marzo de 2006, y 60/844.855, depositada el 15 de Septiembre de 2006, cuyas solicitudes son aquí incorporadas como
10 referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Los trastornos del hueso, que van de la osteoporosis a las fracturas, representan un grupo de estados patológicos para los cuales existen pocos agentes
15 farmacéuticos efectivos. El tratamiento, en lugar de ello, se centra en intervenciones físicas y comportamentales, incluyendo la inmovilización, el ejercicio y los cambios en la dieta. Sería beneficioso disponer de agentes terapéuticos que promuevan el crecimiento óseo y aumenten
20 la densidad ósea con el fin de tratar una variedad de enfermedades óseas.

- El crecimiento y la mineralización del hueso dependen de las actividades de dos tipos celulares, los osteoclastos y los osteoblastos, aunque los condrocitos y
25 las células de la vasculatura también participan en aspectos críticos de estos procesos. En el desarrollo, la formación de hueso se produce a través de dos mecanismos, la osificación endocondral y la osificación intramembranosa, siendo la primera responsable de la
30 formación longitudinal del hueso y la segunda responsable de la formación de huesos topológicamente planos, tales como los huesos del cráneo. La osificación endocondral requiere la formación y degradación secuenciales de estructuras cartilaginosas en las placas de crecimiento que
35 sirven como plantillas para la formación de osteoblastos, de osteoclastos y de la vasculatura y para la posterior

mineralización. Durante la osificación intramembranosa, se forma el hueso directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y la posterior deposición de matriz.

5 Las fracturas y otras roturas estructurales del hueso se curan por un proceso que, al menos superficialmente, se parece a la secuencia de los fenómenos del desarrollo de la osteogénesis, incluyendo la formación de tejido cartilaginoso y la posterior mineralización. El
10 proceso de curación de fracturas puede ocurrir de dos formas. La curación directa o primaria del hueso se produce sin formación de callo; la curación indirecta o secundaria del hueso se produce con una fase precursora de callo. La curación primaria de fracturas conlleva la reformación de
15 la continuidad mecánica a través de una rotura estrechamente dispuesta. En condiciones adecuadas, las células de resorción ósea que rodean a la rotura muestran una respuesta de resorción con tunelización y establecen vías para la penetración de vasos sanguíneos y para la
20 posterior curación. La curación secundaria de huesos sigue un proceso de inflamación, formación de callo blando, mineralización del callo y remodelación del callo. En la fase de inflamación, se produce formación de hematomas y hemorragias como resultado de la rotura de los vasos
25 sanguíneos periósteos y endósteos en el sitio de la lesión. Las 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, formando tejido de granulación en el espacio entre
30 los fragmentos de la fractura. Se establece la unión clínica a través de la rotura por tejido fibroso o cartilaginoso (callo blando). Se forman osteoblastos y éstos median en la mineralización del callo blando, que se substituye entonces por hueso lamelar y queda sometido a
35 los procesos normales de remodelación.

Además de fracturas y otras roturas físicas de

la estructura ósea, la pérdida de contenido óseo mineral y de masa ósea pueden estar causadas por una amplia variedad de condiciones y pueden dar lugar a problemas médicos significativos. Se producen cambios en la masa ósea de un modo relativamente predecible a lo largo de la vida de un individuo. Hasta aproximadamente la edad de 30, los huesos tanto de hombres como de mujeres crecen hasta su masa máxima por crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondrales y crecimiento radial. Después de aproximadamente la edad de 30 (para el hueso trabecular, v.g., huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y la edad de 40 (para el hueso cortical, v.g., huesos largos que se encuentran en los miembros), se produce una lenta pérdida ósea tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, se produce también una fase final de pérdida ósea substancial, probablemente debido a deficiencias estrogénicas posmenopáusicas. Durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y un 25% del compartimento trabecular. El que una pérdida ósea progresiva dé lugar a una condición patológica, tal como la osteoporosis, depende en gran medida de la masa ósea inicial del individuo y de si existen condiciones exacerbantes.

La pérdida ósea se caracteriza a veces como un desequilibrio en el proceso de remodelación normal del hueso. El hueso sano está constantemente sujeto a remodelación. La remodelación comienza con resorción del hueso por los osteoclastos. El hueso resorbido es entonces substituido por nuevo tejido óseo, que se caracteriza por formación de colágeno por los osteoblastos y posterior calcificación. En individuos sanos, las velocidades de resorción y formación están equilibradas. La osteoporosis es una condición progresiva crónica, marcada como un desvío hacia la resorción, dando lugar a una disminución global de la masa ósea y de la mineralización ósea. La osteoporosis en humanos va precedida de osteopenia clínica (densidad

mineral del hueso mayor de una desviación estándar, pero menor de 2,5 desviaciones estándar por debajo del valor medio para el hueso adulto joven). Aproximadamente 75 millones de personas tienen riesgo de osteoporosis en todo el mundo.

Así, los métodos para controlar el equilibrio entre la actividad de osteoclastos y osteoblastos pueden ser útiles para promover la curación de fracturas y otras lesiones del hueso, así como para el tratamiento de trastornos, tales como la osteoporosis, asociados a pérdida de masa ósea y de mineralización ósea.

Con respecto a la osteoporosis, se usan estrógenos, calcitonina, osteocalcina con vitamina K o altas dosis de calcio en la dieta todos ellos como intervenciones terapéuticas. Otras aproximaciones terapéuticas a la osteoporosis incluyen bisfosfonatos, hormona paratiroidea, calcimiméticos, estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio y fluoruro de sodio. Dichos agentes terapéuticos, sin embargo, se asocian frecuentemente a efectos colaterales indeseables.

Es, por lo tanto, un objeto de la presente descripción proporcionar composiciones y métodos para promover el crecimiento y la mineralización del hueso.

RESUMEN DE LA INVENCION

En parte, la descripción demuestra que se pueden usar moléculas que tienen actividad antagonista de la activina o de ActRIIa ("antagonistas de activina" y "antagonistas de ActRIIa") para aumentar la densidad ósea, promover el crecimiento óseo y/o aumentar la resistencia ósea. En particular, la descripción demuestra que una forma soluble de ActRIIa actúa como inhibidor de la señalización de activina-ActRIIa y promueve mayor densidad ósea, crecimiento óseo y resistencia ósea *in vivo*. Aunque la mayoría de los agentes farmacéuticos que promueven el crecimiento óseo o inhiben la pérdida ósea actúan como agentes anticatabólicos (a los que también se hace

comúnmente referencia como "agentes catabólicos") (v.g., bisfosfonatos) o agentes anabólicos (v.g., hormona paratiroidea, PTH, cuando se dosifica apropiadamente), la proteína ActRIIa soluble exhibe una actividad doble, con efectos tanto catabólicos como anabólicos. Así, la descripción establece que los antagonistas de la ruta de señalización de activina-ActRIIa pueden ser usados para aumentar la densidad del hueso y promover el crecimiento del hueso. Aunque la ActRIIa soluble puede afectar al hueso por un mecanismo distinto del antagonismo de la activina, la descripción demuestra, no obstante, que se pueden seleccionar agentes terapéuticos deseables en base a la actividad antagonista de activina-ActRIIa. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la descripción proporciona métodos para usar antagonistas de activina-ActRIIa, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa que se unen a activina, anticuerpos anti-activina, anticuerpos anti-ActRIIa, pequeñas moléculas y aptámeros dirigidos a activina o a ActRIIa y ácidos nucleicos que reducen la expresión de la activina y de la ActRIIa, para tratar trastornos asociados a una baja densidad ósea o una baja resistencia ósea, tales como la osteoporosis, o para promover el crecimiento óseo en pacientes que lo necesiten, tal como en pacientes que tienen una fractura ósea. Adicionalmente, el polipéptido ActRIIa soluble promueve el crecimiento óseo sin causar un aumento consistentemente mensurable en la masa muscular.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona polipéptidos consistentes en un polipéptido ActRIIa soluble que se une a activina. Los polipéptidos ActRIIa pueden ser formulados como una preparación farmacéutica consistente en el polipéptido ActRIIa que se une a activina y un soporte farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el polipéptido ActRIIa que se une a activina se une a activina con una K_D menor de 1 micromolar o menor de 100, 10 ó 1 nanomolar. Eventualmente, el polipéptido ActRIIa que se une a activina se une selectivamente a la activina frente a

GDF11 y/o GDF8, y preferiblemente con una K_D que es al menos 10 veces menor, 20 veces menor o 50 veces menor con respecto a la activina que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Aunque no queremos inclinarnos por un mecanismo particular de acción, se espera que este grado de selectividad para la inhibición de la activina sobre la inhibición de GDF11/GDF8 dé cuenta del efecto selectivo sobre el hueso sin un efecto consistentemente mensurable sobre el músculo. En muchas realizaciones, el polipéptido ActRIIa será seleccionado para que cause menos de un 15%, menos de un 10% o menos de un 5% de aumento en el músculo a dosis que consiguen efectos deseables sobre el hueso. Preferiblemente, la composición es al menos un 95% pura con respecto a otros componentes polipeptídicos, según se valora por cromatografía de exclusión por tamaños, y más preferiblemente la composición es al menos un 98% pura. Un polipéptido ActRIIa que se une a activina para uso en dicha preparación puede ser cualquiera de los aquí descritos, tal como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 2, 3, 7 ó 12, o que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 2, 3, 7, 12 ó 13. Un polipéptido ActRIIa que se une a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIa natural, tal como uno que contenga al menos 10, 20 ó 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada entre las SEC ID N°: 1-3 o una secuencia de la SEC ID N°: 2, carente de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola").

Un polipéptido ActRIIa que se une a activina soluble puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (v.g., en el dominio de unión a ligando) en relación a un polipéptido ActRIIa natural. Se facilitan ejemplos de polipéptidos ActRIIa alterados en WO 2006/012627, pp. 59-60, aquí incorporada como referencia. La alternación en la secuencia de aminoácidos puede, por

ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, insecto u otro eucarionte, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación al polipéptido ActRIIa natural.

- 5 Un polipéptido ActRIIa que se une a activina puede ser una proteína de fusión que tenga, como un dominio, un polipéptido ActRIIa (v.g., una porción de unión a ligando de una ActRIIa) y uno o más dominios adicionales que proporcionen una propiedad deseable, tal como una mejor
- 10 farmacocinética, una más fácil purificación, abordaje de tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede aumentar una o más de estabilidad in vivo, vida media in vivo, captación / administración, localización o distribución en tejidos, formación de
- 15 complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Una proteína de fusión ActRIIa de unión a activina puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante) o una porción de seroalbúmina o de otro polipéptido que proporcione
- 20 propiedades deseables, tales como una mejor farmacocinética, una mejor solubilidad o una mejor estabilidad. En una realización preferida, una fusión ActRIIa-Fc consiste en un enlazante relativamente desestructurado situado entre el dominio Fc y el dominio
- 25 ActRIIa extracelular. Este enlazante desestructurado puede corresponder a la región desestructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIa (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos o una
- 30 longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria, o una mezcla de ambas. Un enlazante puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una sola secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias
- 35 repetitivas de treonina/serina y glicinas (v.g., singletes o repeticiones TG_n o SG_n). Una proteína de fusión puede

- incluir una subsecuencia de purificación, tal como un marcaje epitópico, un marcaje FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST. Eventualmente, un polipéptido ActRIIa soluble incluye uno o más residuos de
- 5 aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.
- 10 Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto usado para tratar un trastorno óseo. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está substancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible expresar una proteína
- 15 ActRIIa en una línea celular de mamíferos que media adecuadamente en la glicosilación natural de la proteína ActRIIa para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente. Se han usado con éxito líneas celulares humanas y CHO y se espera que otros
- 20 sistemas de expresión de mamíferos comunes resulten útiles.

Tal como se describe aquí, las proteínas ActRIIa designadas como ActRIIa-Fc (una forma con un enlazante mínimo entre la porción ActRIIa y la porción Fc) tienen propiedades deseables, incluyen unión selectiva a

25 activina frente a GDF8 y/o GDF11, unión a ligandos de alta afinidad y vida media en suero mayor de dos semanas en modelos animales. En ciertas realizaciones, la invención proporciona polipéptidos ActRIIa-Fc y preparaciones farmacéuticas que contienen dichos polipéptidos y un

30 excipiente farmacéuticamente aceptable.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble. Un polinucleótido aislado puede incluir una secuencia codificante para un polipéptido

35 ActRIIa de unión a activina soluble, tal como se ha descrito antes. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado

puede incluir una secuencia codificante de un dominio extracelular (v.g., dominio de unión a ligando) de una ActRIIa y una secuencia que codificaría para parte o todo del dominio de transmembrana y/o del dominio citoplásmico de una ActRIIa, salvo para un codon de parada situado en el

5 dominio de transmembrana o el dominio citoplásmico, o situado entre el dominio extracelular y el dominio de transmembrana o dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede incluir una secuencia

10 polinucleotídica ActRIIa de longitud completa, tal como la SEC ID N°: 4 ó 5, o una versión parcialmente truncada, incluyendo dicho polinucleótido aislado además un codon de finalización de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o de algún otro modo

15 situado de tal forma que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular eventualmente fusionado a una porción truncada de una ActRIIa de longitud completa. Una secuencia de ácido nucleico preferida es la SEC ID N°: 14. Los ácidos nucleicos aquí descritos pueden estar

20 operativamente unidos a un promotor para expresión y la descripción proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona

25 métodos para preparar un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble. Dicho método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (v.g., SEC ID N°: 4, 5 ó 14) aquí descritos en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster Chino (CHO). Dicho método puede

30 consistir en: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRIIa soluble, donde dicha célula es transformada con una construcción de expresión de ActRIIa soluble, y b) recuperar el polipéptido ActRIIa soluble así expresado. Se

35 pueden recuperar los polipéptidos ActRIIa solubles como fracciones brutas, parcialmente purificadas o altamente

purificadas. Se puede conseguir la purificación por una serie de etapas de purificación, incluyendo, por ejemplo, una, dos o tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de
 5 intercambio aniónico (v.g., Q-sefarosa), cromatografía de interacción hidrofóbica (v.g., fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio catiónico.

En ciertos aspectos, se puede usar un
 10 antagonista activina-ActRIIa aquí descrito, tal como un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble, en un método para promover el crecimiento óseo o aumentar la densidad ósea en un sujeto. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona métodos para tratar un trastorno
 15 asociado a baja densidad ósea, o para promover el crecimiento del hueso, en pacientes que lo necesiten. Un método puede consistir en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de antagonista activina-ActRIIa. En ciertos aspectos, la descripción proporciona
 20 usos del antagonista activina-ActRIIa para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o condición como aquí se describe.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para identificar un agente que estimula el
 25 crecimiento, o aumenta la mineralización, del hueso. El método consiste en: a) identificar un agente de ensayo que se une a activina o un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActRIIa, y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento o la mineralización del hueso.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la purificación de ActRIIa-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un solo pico, bien definido.

La Figura 2 muestra la unión de ActRIIa-hFc a
 35 activina y GDF-11, según se mide por un ensayo BiaCore™.

La Figura 3 muestra un esquema para el Ensayo

de Genes Informadores A-204. La figura muestra el vector Informador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Denmler y col., 1998, EMBO 17: 3091-3100). La unidad CAGA12 está presente en genes que responden a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para factores que señalizan a través de Smad 2 y 3.

La Figura 4 muestra los efectos de ActRIIa-hFc (diamantes) y ActRIIa-mFc (cuadrados) sobre la señalización GDF-8 en el Ensayo de Genes Informadores A-204. Ambas proteínas exhibían una inhibición substancial de la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares.

La Figura 5 muestra los efectos de tres preparaciones diferentes de ActRIIa-hFc sobre la señalización de GDF-11 en el Ensayo de Genes Informadores A-204.

La Figura 6 muestra ejemplos de imágenes DEXA de ratones BALB/c tratados con control y con ActRIIa-mFc, antes (paneles superiores) y después (paneles inferiores) del período de tratamiento de 12 semanas. El sombreado más pálido indica un aumento en la densidad ósea.

La Figura 7 muestra una cuantificación de los efectos de ActRIIa-mFc sobre la densidad mineral del hueso en ratones BALB/c a lo largo del período de 12 semanas. Los tratamientos fueron: control (diamantes), dosificación de 2 mg/kg de ActRIIa-mFc (cuadrados), dosificación de 6 mg/kg de ActRIIa-mFc (triángulos) y dosificación de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (círculos).

La Figura 8 muestra una cuantificación de los efectos de ActRIIa-mFc sobre el contenido mineral del hueso en ratones BALB/c a lo largo del período de 12 semanas. Los tratamientos fueron: control (diamantes), dosificación de 2 mg/kg de ActRIIa-mFc (cuadrados), dosificación de 6 mg/kg de ActRIIa-mFc (triángulos) y dosificación de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (círculos).

La Figura 9 muestra una cuantificación de los

efectos de ActRIIa-mFc sobre la densidad mineral ósea del hueso trabecular en ratones C57BL6 ovariectomizados (OVX) o sometidos a una operación de simulacro (SHAM) a lo largo de un período de 6 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS) o dosificación de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (ActRIIa).

La Figura 10 muestra una cuantificación de los efectos de ActRIIa-mFc sobre el hueso trabecular en ratones C57BL6 ovariectomizados (OVX) a lo largo de un periodo de 12 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS, barras claras) o dosificación de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (ActRIIa, barras oscuras).

La Figura 11 muestra una cuantificación de los efectos de ActRIIa-mFc sobre el hueso trabecular en ratones C57BL6 sometidos a una operación de simulacro después de un período de tratamiento de 6 ó 12 semanas. Los tratamientos fueron control (PBS, barras claras) o dosificación de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (ActRIIa, barras oscuras).

La Figura 12 muestra los resultados del análisis pQCT de la densidad ósea en ratones ovariectomizados a lo largo de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS, barras claras) o ActRIIa-mFc (barras oscuras); eje y: mg/ccm.

La Figura 13 representa los resultados del análisis pQCT de la densidad ósea en ratones sometidos a una operación de simulacro a lo largo de 12 semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS, barras claras) o ActRIIa-mFc (barras oscuras); eje y: mg/ccm.

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

La Figura 15 muestra el análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS, barras oscuras) y ActRIIa-mFc (barras claras). Las cuatro barras de la izquierda muestran la densidad ósea total, mientras

que las cuatro barras de la derecha muestran la densidad ósea cortical. El primer par de barras en cada grupo de cuatro barras representa los datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras
 5 representa los datos de ratones sometidos a una operación de simulacro.

La Figura 16 muestra el análisis pQCT ex vivo y el contenido óseo de diáfisis del eje medio femoral después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control de vehículo (PBS, barras oscuras) o ActRIIa-mFc (barras claras). Las cuatro barras de la izquierda muestran el contenido óseo total, mientras que las cuatro barras de la derecha muestran el contenido óseo cortical. El primer par de barras en cada grupo de cuatro barras representa los
 10 datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa los datos de ratones sometidos a una operación de simulacro.

La Figura 17 muestra el análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral y el grosor cortical femoral. Los tratamientos fueron control (PBS, barras oscuras) o ActRIIa-mFc (barras claras). Las cuatro barras de la izquierda muestran la circunferencia endóstica, mientras que las cuatro barras de la derecha muestran la circunferencia perióstica. El primer par de barras en cada
 20 grupo de cuatro barras representa los datos de ratones ovariectomizados, mientras que el segundo par de barras representa los datos de ratones sometidos a una operación de simulacro.

La Figura 18 representa los resultados de las pruebas mecánicas de fémures después de doce semanas de tratamiento. Los tratamientos fueron control (PBS, barras oscuras) y ActRIIa-mFc (barras claras). Las dos barras de la izquierda representan los datos de ratones ovariectomizados, mientras que las dos últimas barras
 30 representan los datos de ratones sometidos a una operación de simulacro.

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

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

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

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

La Figura 23 muestra los efectos de diferentes
10 dosis de ActrIIa-mFc sobre las características del hueso a tres dosificaciones diferentes.

La Figura 24 muestra la histomorfometría ósea, que indica que ActrIIa-mFc tiene una actividad doble anabólica y anti-resorción.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Visión general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de
20 secuencia y unidades estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan importantes funciones durante el desarrollo embrionario en
25 la formación de patrones y en la especificación tisular y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo la adipogénesis, la miogénesis, la condrogénesis, la cardiogénesis, la hematopoyesis, la neurogénesis y la diferenciación de las células
30 epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, frecuentemente complementarios. Manipulando la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, es con frecuencia posible producir cambios
35 fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas vacunas Piedmontese y Belgian Blue llevan una

mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que provoca un marcado aumento en la masa muscular. Grobet y col., Nat. Genet. 1997, 17(1): 71-4. Más aún, en humanos, los alelos inactivos de GDF8 se
 5 asocian a un aumento en la masa muscular y, según se ha descrito, a una fuerza excepcional. Schuelke y col., N. Engl. J. Med. 2004, 350: 2682-8.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia
 10 TGF-beta. 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 también codifica una activina C y una activina E, que se expresan primariamente en el hígado. En la
 15 superfamilia TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células de ovario y placenta, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir en el progreso de los ciclos celulares positiva o negativamente
 20 dependiendo del tipo celular e inducir la diferenciación del mesodermo al menos en embriones de anfibios (DePaolo y col., 1991, Proc. Soc. Ep. Biol. Med., 198: 500-512; Dyson y col., 1997, Curr. Biol., 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem. Pharmacol., 55: 953-963). Más aún, se vio que el
 25 factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata y col., 1988, PNAS, 85: 2434). Se ha sugerido que la activina A actúa como un regulador positivo natural de la eritropoyesis en la médula
 30 ósea. En diversos tejidos, la señalización de la activina resulta antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de hormona estimulante del folículo (FSH) por la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras
 35 que la inhibina previene la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la

activina y/o unirse a la activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con la folistatina (FSRP), α_2 -macroglobulina, Cerberus y endogлина.

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

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

Como se demuestra aquí, un polipéptido ActRIIa soluble (sActRIIa), que muestra una preferencia substancial en la unión a activina A en oposición a otros miembros de

la familia TGF-beta, tales como GDF8 o GDF11, es efectivo para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea *in vivo*. Aunque no queremos inclinarnos por ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de sActRIIa esté causado primariamente por un efecto antagonista de activina, dada la muy fuerte unión a activina (constante de disociación picomolar) exhibida por la construcción sActRIIa particular usada en estos estudios. Independientemente del mecanismo, es aparente por los datos aquí presentados que los antagonistas ActRIIa-activina ciertamente aumentan la densidad ósea en ratones normales y en modelos de ratón para la osteoporosis. Habría que observar que el hueso es un tejido dinámico, con crecimiento o encogimiento y mayor o menor densidad dependiendo de un equilibrio de factores que producen hueso y estimulan la mineralización (primariamente osteoblastos) y factores que destruyen y desmineralizan el hueso (primariamente osteoclastos). El crecimiento y la mineralización del hueso pueden aumentar aumentando los factores productivos, disminuyendo los factores destructivos o ambas cosas. Los términos "promover el crecimiento óseo" y "aumentar la mineralización ósea" se refieren a los cambios físicos observables en el hueso y se pretende que sean neutros en cuanto al mecanismo mediante el cual se producen los cambios en el hueso.

Los modelos en ratón para la osteoporosis y el crecimiento/densidad del hueso que se usaron en los estudios aquí descritos son considerados como altamente predictivos de la eficacia en humanos y, por lo tanto, esta descripción proporciona métodos para usar polipéptidos ActRIIa y otros antagonistas activina-ActRIIa para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea en humanos. Como antagonistas activina-ActRIIa, se incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles de unión a activina, anticuerpos que se unen a actina (particularmente las subunidades de activina A o B, a las que también se hace

referencia como βA o βB) y rompen la unión con ActRIIa, anticuerpos que se unen a ActRIIa y rompen la unión con la activina, proteínas que no son anticuerpos seleccionadas para la unión a activina o ActRIIa (véase, v.g.,

5 WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, EE.UU. 2003/0133939 y EE.UU. 2005/0238646 en cuanto a ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y selección de las mismas) y péptidos aleatorizados seleccionados en cuanto a la unión a activina o ActRIIa,

10 frecuentemente fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina o ActRIIa, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (v.g., un receptor de actina de tipo I soluble) y de tipo II (v.g., un

15 receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, pueden unirse entre sí o crear una molécula de unión bifuncional. Aptámeros de ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y otros agentes que inhiben el eje de señalización activina-ActRIIa. Diversas proteínas tienen

20 actividad antagonista activina-ActRIIa, incluyendo inhibina (es decir, subunidad alfa de la inhibina), aunque la inhibina no antagoniza de manera universal la activina en todos los tejidos, folistatina (v.g., folistatina-288 y folistatina-315), Cerberus, FSRP, endogлина, activina C,

25 alfa(2)-macroglobulina y un mutante de activina A M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). En general, las formas alternativas de activina, particularmente las que tienen alteraciones en el dominio de unión al receptor de tipo I, pueden unirse a los

30 receptores de tipo II y no consiguen formar un complejo ternario activo, actuando así como antagonistas. Adicionalmente, se pueden usar ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, siARN o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, en particular, la expresión de

35 ActRIIa, como antagonistas activina-ActRIIa. Preferiblemente, el antagonista activina-ActRIIa que se va

a usar exhibirá selectividad por la inhibición de la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11. Las proteínas ActRIIb solubles sí se unen a

5 activina; sin embargo, la proteína de tipo salvaje no exhibe selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11 y experimentos preliminares sugieren que esta proteína no proporciona los efectos deseados sobre el hueso, mientras que también causa un crecimiento

10 substancial del músculo. Sin embargo, se han identificado formas alteradas de ActRIIb con diferentes propiedades de unión (véase, v.g., WO 2006/012627, pp. 55-59, aquí incorporada como referencia) y estas proteínas pueden conseguir los efectos deseados sobre el hueso. Se puede dar

15 a la ActRIIb nativa o alterada una especificidad añadida por la activina copulando con un segundo agente de unión selectivo para la activina.

Los términos usados en esta descripción tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica,

20 dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en que se usa cada término. Ciertos términos son discutidos a continuación o en algún otro lado de la descripción para aportar una guía adicional al práctico en la descripción de las composiciones y métodos de la

25 invención y de cómo producirlas y usarlas. El alcance o significado de cualquier uso de un término será aparente por el contexto específico en que se usa el término.

"Alrededor de" y "aproximadamente" significarán, en general, un grado aceptable de error para

30 la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10% y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o rango de valores dados.

35 Alternativamente, y en particular en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente"

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

Los métodos de la invención pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, incluyendo
 10 una secuencia de tipo salvaje con una o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones consisten típicamente en alineaciones de secuencias poliméricas, v.g., usando programas de alineación de secuencias y/o algoritmos bien conocidos en la técnica (por ejemplo,
 15 BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos cuantos). El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que, en dichas alineaciones, cuando una mutación contiene una inserción o delección de residuo, la alineación de secuencia introducirá un "hueco" (típicamente representado por un
 20 guión o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el residuo insertado o suprimido.

"Homólogas", en todas sus formas gramaticales y variantes ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común",
 25 incluyendo proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Dichas proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, según se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en
 30 términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o unidades específicas 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 de
 35 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 está modificado con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos ActRIIa

En ciertos aspectos, la presente invención se relaciona con polipéptidos ActRIIa. Tal como se usa aquí, el término "ActRIIa" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina de tipo IIa (ActRIIa) de cualquier especie y a variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIa por mutagénesis u otras modificaciones. Se entiende aquí la referencia a ActRIIa como una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActRIIa son generalmente proteínas de transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio de transmembrana y un dominio citoplásmico con actividad serina/treonina kinasa predicha.

El término "polipéptido ActRIIa" incluye polipéptidos consistentes en cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActRIIa, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conserve una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIa incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIa conocida que tienen una secuencia al menos aproximadamente un 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIa y preferiblemente una identidad de al menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o superior. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa de la invención puede unirse a, e inhibir, la función de una proteína ActRIIa y/o activina. Preferiblemente, un polipéptido ActRIIa promueve el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Como ejemplos de polipéptidos ActRIIa, se incluyen el polipéptido precursor de ActRIIa humano (SEC ID N°: 1) y los polipéptidos ActRIIa

humanos solubles (v.g., SEC ID N°: 2, 3, 7 y 12).

La secuencia de la proteína precursora del ActRIIa humano es la siguiente:

MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRH
 5 CFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
 EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLVSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQD
 PGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVY
 SLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAET
 MARGLAYLHEDIPLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGALALKEAGKSAG
 10 DTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYML
 PFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSA
 GCVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESSL

(SEC ID N°: 1)

El péptido señal tiene un subrayado simple; el
 15 dominio extracelular está en negrilla y los sitios de
 glicosilación ligada a N potenciales tienen un doble
 subrayado.

La secuencia del polipéptido procesado ActRIIa humano soluble (extracelular) es la siguiente:

20 ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
 LDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTSNPVTPKPP

(SEC ID N°: 2)

La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" suprimida (una
 25 secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
 LDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM (SEC ID N°: 3)

La secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína precursora de ActRIIa humana es la siguiente
 30 (nucleótidos 164-1705 de la entrada del Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
 TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
 ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
 TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG
 35 GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
 AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA

GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAA
 CATCCTGCTCTATTTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
 TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCCAACTCAAGAC
 CCAGGACCACCCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
 5 GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
 CTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAATGAATACGAAGTCTAC
 AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG
 CACCAGTGTTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCATAT
 CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACC
 10 ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
 ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
 CAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTGGCCTTAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
 GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
 TATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
 15 TATGGGAAGTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
 CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
 GCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
 TGCTCTGTGAAACCATGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
 GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA
 20 GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTA
 GTCTATGA (SEC ID N°: 4)

La secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido ActRIIa humano soluble (extracelular) es la siguiente:

25 ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA
 CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
 GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGG
 CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
 AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG
 30 AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEC ID
 N°: 5)

En una realización específica, la invención se relaciona con polipéptidos ActRIIa solubles. Tal como se describe aquí, el término "polipéptido ActRIIa soluble" se
 35 refiere, en general, a polipéptidos que incluyen un dominio extracelular de una proteína ActRIIa. El término

"polipéptido ActRIIa soluble", tal como se usa aquí, incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActRIIa, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActRIIa de unión a 5 activina es uno que conserva la capacidad de unirse a la activina, particularmente a la activina AA, AB o BB. Preferiblemente, un polipéptido ActRIIa de unión a activina se unirá a la activina AA con una constante de disociación 10 de 1 nM o menos. A continuación se proporcionan las secuencias de aminoácidos de la proteína precursora ActRIIa humana. El dominio extracelular de una proteína ActRIIa se une a la activina y es generalmente soluble, y por ello puede denominarse un polipéptido ActRIIa de unión a 15 activina soluble. Como ejemplo de polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles, se incluye el polipéptido soluble ilustrado en las SEC ID N°: 2, 3, 7, 12 y 13. Se hace referencia a la SEC ID N°: 7 como ActRIIa-hFc y se describe aún más en los Ejemplos. Otros ejemplos de 20 polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles incluyen una secuencia de señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIa, por ejemplo la secuencia líder de la melitina de abejas melíferas (SEC ID N°: 8), el líder del activador del plasminógeno de los tejidos (TPA) (SEC ID N°: 9) o el líder ActRIIa nativo (SEC ID N°: 10). El 25 polipéptido ActRIIa-hFc ilustrado en la SEC ID N°: 13 usa un líder TPA.

Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIa rastreando polipéptidos 30 producidos recombinantemente a partir del correspondiente fragmento del ácido nucleico codificante de un polipéptido ActRIIa. Además, se pueden sintetizar químicamente fragmentos usando técnicas conocidas en este campo, tales como la química convencional de f-Moc o t-Boc en fase 35 sólida de Merrifield. Los fragmentos pueden ser producidos (recombinantemente o por síntesis química) y estudiados

para identificar aquellos fragmentos peptidilicos que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIa o de la señalización mediada por activina.

Se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRIIa rastreando librerías de polipéptidos modificados producidos recombinantemente a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes codificantes de un polipéptido ActRIIa. Las variantes pueden ser producidas y estudiadas para identificar las que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIa o de la señalización mediada por activina. En ciertas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIa consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 2 ó 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 2 ó 3.

Se pueden generar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido ActRIIa con fines tales como el aumento de la eficacia terapéutica o la estabilidad (v.g., vida útil de almacén ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Dichos polipéptidos ActRIIa modificados, cuando se seleccionan para que conserven la unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIa naturales. También se pueden producir polipéptidos ActRIIa modificados, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, de un aspartato con un glutamato, de 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. Son substituciones conservadoras aquéllas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. El que un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIa dé lugar a un homólogo funcional puede ser fácilmente determinado valorando la capacidad del polipéptido ActRIIa variante para producir una respuesta en células de un modo similar al polipéptido ActRIIa de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIa para alterar la glicosilación del polipéptido. Dichas mutaciones pueden ser seleccionadas para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación ligados a O o ligados a N. Los sitios de reconocimiento de la glicosilación ligados a asparragina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparragina-X-treonina (o asparraginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) específicamente reconocida por enzimas de glicosilación celulares apropiadas. También se puede hacer la alteración por adición de, o substitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIa de tipo salvaje (para sitios de glicosilación ligados a O). Una variedad de substituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) da lugar a no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumento del número de restos carbohidratados sobre un polipéptido ActRIIa es por copulación química o enzimática de glicósidos al polipéptido ActRIIa. Dependiendo del modo de copulación utilizado, el/los azúcar(es) puede(n) unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos

sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, la treonina o la hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, la tirosina o el triptófano, o

5 (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos están descritos en WO 87/05330, publicada el 11 de Septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981), CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, aquí incorporadas como referencia. La eliminación de uno o más restos carbohidratados presentes

10 en un polipéptido ActRIIa puede ser acometida química y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede incluir, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIa al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la escisión de la

15 mayoría de los azúcares o de todos ellos, a excepción del azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando al mismo tiempo intacta la secuencia de aminoácidos. La desglicosilación química es descrita más ampliamente por Hakimuddin y col.. (1987)

20 Arch. Biochem. Biophys. 259:52, y por Edge y col., (1981) Anal. Biochem. 118:131. Se puede conseguir la escisión enzimática de restos de carbohidratos sobre los polipéptidos ActRIIa usando una variedad de endo- y exoglicosidasas, como describen Thotakura y col., (1987) Meth.

25 Enzymol. 138:350. Se puede ajustar la secuencia de un polipéptido ActRIIa, según resulte apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden todas ellas introducir diferentes patrones de glicosilación que

30 pueden resultar afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIa para uso en humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glicosilación apropiada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras

35 líneas celulares de expresión en mamíferos, líneas celulares de levaduras con enzimas de glicosilación de

ingeniería y células de insecto sean útiles también.

Esta descripción contempla además un método de generación de mutantes, particularmente grupos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIa, así como mutantes de truncación; los conjuntos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El fin del cribado de dichas librerías combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes del polipéptido ActRIIa que puedan actuar como agonistas o antagonista, o alternativamente que posean nuevas actividades en conjunto. Se facilita a continuación una variedad de ensayos de cribado, y dichos ensayos pueden ser usados para evaluar variantes. Por ejemplo, se puede cribar una variante polipeptídica ActRIIa en cuanto a su capacidad para unirse a un ligando ActRIIa, para prevenir la unión de un ligando ActRIIa a un polipéptido ActRIIa o para interferir con la señalización causada por un ligando ActRIIa.

La actividad de un polipéptido ActRIIa o de sus variantes puede ser también estudiada en un ensayo basado en células o *in vivo*. Por ejemplo, se puede determinar el efecto de una variante polipeptídica ActRIIa sobre la expresión de genes implicados en la producción del hueso o en la destrucción del hueso. Se puede realizar éste, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas ligando ActRIIa recombinantes (v.g., activina), y se pueden transfectar células para producir un polipéptido ActRIIa y/o variantes del mismo, y eventualmente un ligando ActRIIa. De igual modo, se puede administrar un polipéptido ActRIIa a un ratón u otro animal y se pueden valorar una o más propiedades del hueso, tales como densidad o volumen. También se puede evaluar la velocidad de curación de las fracturas óseas. La absorciometría de rayos x de energía doble (DEXA) es una técnica cuantitativa no invasiva bien establecida para valorar la densidad ósea en un animal. En humanos, los sistemas DEXA centrales

pueden ser usados para evaluar la densidad ósea en la columna y en la pelvis. Estas son las que mejor predicen la densidad ósea global. Se pueden usar sistemas DEXA periféricos para evaluar la densidad ósea en huesos periféricos, incluyendo, por ejemplo, los huesos de la mano, de la muñeca, del tobillo y del pie. Se pueden usar los sistemas tradicionales de imagen por rayos x, incluyendo los barridos CAT, para evaluar el crecimiento del hueso y la curación de fracturas. También se puede evaluar la resistencia mecánica del hueso.

Se pueden generar variantes combinatoriamente derivadas que tengan una potencia selectiva o generalmente mayor en relación a un polipéptido ActRIIa natural. De igual modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan vidas medias intracelulares dramáticamente diferentes a las correspondientes a un polipéptido ActRIIa de tipo salvaje. Por ejemplo, se puede hacer que la proteína alterada sea o bien más estable o bien menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que dan lugar a destrucción o de algún otro modo inactivación de un polipéptido ActRIIa nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden ser utilizadas para alterar los niveles de polipéptido ActRIIa modulando la vida media de los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido ActRIIa recombinante en el paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el enlazante (de haberlo) y/o la porción Fc para alterar la vida media de la proteína.

Se puede producir una librería combinatoria por medio de una librería degenerada de genes codificantes de una librería de polipéptidos que incluyen cada uno al menos una porción de secuencias polipeptídicas ActRIIa potenciales. Por ejemplo, se puede ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias

génicas de tal forma que el grupo degenerado de secuencias nucleotídicas del polipéptido ActRIIa potenciales sean expresables como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un grupo de proteínas de fusión
5 mayores (v.g., para exhibición de fagos).

Existen muchas maneras por las cuales se puede generar la librería de homólogos potenciales a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Se puede realizar la síntesis química de una secuencia génica
10 degenerada en un sintetizador de ADN automático y ligar entonces los genes sintéticos en un vector apropiado para expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura y col., (1981)
15 Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura y col., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura y col., (1984) Science 198: 1056; Ike y col., (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477). Dichas técnicas han sido
20 empleadas en la evolución dirigida de otras proteínas (véanse, por ejemplo, Scott y col., (1990) Science 249: 386-390; Roberts y col., (1992) PNAS USA 89: 2429-2433; Devlin y col., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla y col., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las Patentes EE.UU.
25 N° 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una librería combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar y aislar variantes polipeptídicas ActRIIa a partir de una librería
30 para cribado usando, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina y similares (Ruf y col., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang y col., (1994) J. Biol. Chem. 269: 3095-3099; Balint y col., (1993) Gene 137: 109-118; Grodberg y col., (1993) Eur. J. Biochem. 218: 597-601; Nagashima y
35 col., (1993) J. Biol. Chem. 268: 2888-2892; Lowman y col., (1991) Biochemistry 30: 10832-10838; y Cunningham y col.,

(1989) Science 244: 1081-1085), mutagénesis de barrido de enlazante (Gustin y col., (1993) Virology 193: 653-660; Brown y col., (1992) Mol. Cell Biol. 12: 2644-2652; McKnight y col., (1982) Science 232: 316), mutagénesis de saturación (Meyers y col., (1986) Science 232: 613); mutagénesis por PCR (Leung y col., (1989) Method Cell Mol Biol 1: 11-19) o mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller y col., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener y col., (1994) Strategies in Mol Biol 7: 32-34). La mutagénesis de barrido de enlazante, particularmente en un marco combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIa.

Se conocen un amplio rango de técnicas en el campo del cribado de productos génicos de librerías combinatorias producidas por mutaciones y truncaciones puntuales y, por esa razón, del cribado de librerías de ADNc para productos génicos que tienen una determinada propiedad. Dichas técnicas serán en general adaptables al cribado rápido de las librerías génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIa. Las técnicas más ampliamente usadas para cribar grandes librerías génicas comprenden típicamente la clonación de la librería génica en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la librería de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector codificante del gen cuyo producto fue detectado. Como ensayos preferidos, se incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIa de la invención puede incluir también modificaciones posteriores a la traducción además de

cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos ActRIIa. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIa modificados pueden 5 contener elementos distintos de aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Se pueden estudiar los efectos de dichos elementos distintos de aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIa como aquí se describe para otras 10 variantes de polipéptido ActRIIa. Cuando se produce un polipéptido ActRIIa en las células por escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIa, el procesado posterior a la traducción puede ser también importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. 15 Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades posteriores a la traducción y pueden ser seleccionadas para asegurar la modificación y el procesado correctos de los 20 polipéptidos ActRIIa.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o las formas modificadas de los polipéptidos ActRIIa incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una 25 porción de los polipéptidos ActRIIa y uno o más dominios de fusión. Como ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión, se incluyen, aunque sin limitación, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena 30 pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad adecuada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el fin de la purificación 35 por afinidad, se usan matrices relevantes para

cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación GST de Pharmacia y el sistema

5 QIAexpress™ (Qiagen), útiles con compañeros de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIa. Como ejemplos de tales dominios de detección, se incluyen las diversas proteínas fluorescentes (v.g., GFP),

10 así como "marcajes epitópicos", que son normalmente secuencias peptídicas cortas para las que se dispone de un anticuerpo específico. Como marcajes epitópicos bien conocidos para los que se dispone fácilmente de anticuerpos monoclonales específicos, se incluyen FLAG, hemaglutinina

15 del virus de la influenza (HA) y marcajes c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión por proteasas, tal como para el Factor Xa o la Trombina, que permite a la proteasa relevante digerir parcialmente las proteínas de fusión y así liberar de ellas las

20 proteínas recombinantes. Se pueden aislar entonces las proteínas liberadas del dominio de fusión por posterior separación cromatográfica. En ciertas realizaciones preferidas, se fusiona un polipéptido ActRIIa con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIa *in vivo* (un

25 dominio "estabilizador"). Por "estabilizador" se entiende cualquier cosa que aumente la vida media en suero, independientemente de si esto se debe a una menor destrucción, a un menor aclaramiento por el riñón o a otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la

30 porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a un amplio rango de proteínas. De igual modo, las fusiones con la seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden ser seleccionados incluyen

35 dominios de multimerización (v.g., dimerización, trimerización) y dominios funcionales (que confieren una

función biológica adicional, tal como una mayor estimulación del crecimiento óseo o del crecimiento muscular, según se desee).

Como ejemplo específico, la presente invención
5 proporciona una proteína de fusión consistente en un dominio extracelular soluble de ActRIIa fusionado a un dominio Fc (v.g., SEC ID N°: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVLEFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPV
10 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHN(A) HYTQKSL
SLSPGK*

Eventualmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y
15 Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (v.g., mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fcγ en relación a un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas
20 mutaciones (v.g., mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad de unión al receptor Fc relacionado con el MHC de clase I (FcRN) en relación a un dominio Fc de tipo salvaje.

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

En ciertas realizaciones, los polipéptidos
35 ActRIIa de la presente invención contienen una o más modificaciones capaces de estabilizar los polipéptidos

ActRIIa. Por ejemplo, dichas modificaciones aumentan la vida media *in vitro* de los polipéptidos ActRIIa, aumentan la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRIIa o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos

5 ActRIIa. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, aunque sin limitación, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que tienen un polipéptido ActRIIa y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de

10 un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRIIa) y modificaciones de un resto de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, eliminación de restos de carbohidratos de un polipéptido ActRIIa). En el caso de las proteínas de fusión, se fusiona un polipéptido ActRIIa a un dominio

15 estabilizador, tal como una molécula de IgG (v.g., un dominio Fc). Tal como se usa aquí, el término "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (v.g., Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como

20 un resto de carbohidrato o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, la presente invención hace disponibles formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIa, que se aíslan de otras proteínas o

25 están substancialmente libres de ellas. Los polipéptidos ActRIIa serán generalmente producidos por expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos ActRIIa

30 En ciertos aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes codificantes de cualquiera de los polipéptidos ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa solubles), incluyendo los fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión aquí descritos. Por

35 ejemplo, la SEC ID N°: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIa humano natural, mientras que la SEC ID N°: 5

codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser de una sola hebra o de doble hebra. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o de ARN. Estos ácidos nucleicos pueden ser usados, por ejemplo, en métodos para producir polipéptidos ActRIIa o como agentes terapéuticos directos (v.g., en una aproximación de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos en cuestión que codifican los polipéptidos ActRIIa incluyen ácidos nucleicos que son variantes de las SEC ID N°: 4 ó 5. Como secuencias nucleotídicas variantes, se incluyen secuencias que difieren en una o más substituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que son idénticas en al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a las SEC ID N°: 4 ó 5. Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica apreciará que secuencias de ácidos nucleicos complementarias de las SEC ID N°: 4 ó 5, y variantes de las SEC ID N°: 4 ó 5 están también dentro del alcance de esta invención. En otras realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia nucleotídica heteróloga, o en una librería de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención incluyen también secuencias nucleotídicas que se hibridan en condiciones altamente estrictas con la secuencia nucleotídica designada en las SEC ID N°: 4 ó 5, la secuencia complementaria de las SEC ID N°: 4 ó 5 o fragmentos de las mismas. Tal como se ha discutido anteriormente, alguien con conocimientos ordinarios en la técnica entenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de estrictez apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Alguien con conocimientos ordinarios

en la técnica entenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de estrictez apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación a cloruro de sodio/citrato de sodio 6,0 x (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de SSC 2,0 x a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede ser seleccionada de una baja estrictez de aproximadamente SSC 2,0 x a 50°C a una alta estrictez de aproximadamente SSC 0,2 x a 50°C. Además, se puede aumentar la temperatura en la etapa de lavado de condiciones de baja estrictez a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de alta estrictez a aproximadamente 65°C. Se pueden variar tanto la temperatura como la sal, o se puede mantener constante la temperatura o la concentración de sal mientras que se cambia la otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones poco estrictas de SSC 6 x a temperatura ambiente, seguido de un lavado a SSC 2 x a temperatura ambiente.

También se hallan dentro del alcance de la invención ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos expuestos en las SEC ID N°: 4 ó 5 debido a degeneración del código genético. Por ejemplo, una serie de aminoácidos son designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para la histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos en la secuencia de ADN que sí den cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión entre las células de mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que pueden existir estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente un 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos codificantes de una proteína particular entre individuos de una especie dada debido a variación alélica natural. Todas

y cada una de tales variaciones nucleotídicas y que dan lugar a polimorfismos de aminoácidos se hallan dentro del alcance de esta invención.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombina-
 5 ntes de la invención pueden unirse operativamente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias nucleotídicas reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. Se conocen en la técnica
 10 numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y de secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Típicamente, dichas una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, aunque sin limitación, secuencias promotoras, secuencias líder o de
 15 señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y de finalización de la transcripción, secuencias de inicio y de finalización de la traducción y secuencias incrementadoras o activadoras. La invención contempla promotores constitutivos o inducibles tal como se conoce en
 20 la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinen elementos de más de un promotor. Puede estar presente una construcción de expresión en una célula sobre un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede estar
 25 insertada en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped
 30 usada.

En ciertos aspectos de la invención, el ácido nucleico en cuestión es presentado en un vector de expresión que tiene una secuencia nucleotídica codificante de un polipéptido ActRIIa y operativamente unida a al menos
 35 una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y son seleccionadas para dirigir

la expresión del polipéptido ActRIIa. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, incrementadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen ejemplos de secuencias reguladoras en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se unen operativamente a ella en estos vectores para expresar secuencias de ADN codificantes de un polipéptido ActRIIa. Dichas secuencias de control de la expresión de utilidad incluyen los promotores precoz y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor precoz inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, las regiones operadoras y promotoras mayores del fago lambda, las regiones de control para la proteína de revestimiento fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato kinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, v.g., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de levadura, el promotor poliédrico del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe controlan la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y diversas combinaciones de éstos. Habría que entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se ha de transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Más aún, también habría que considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante de la invención ligando el gen clonado, o una

porción del mismo, en un vector adecuado para expresión en células procarióticas, células eucarióticas (de levaduras, aves, insectos o mamíferos) o ambas. Como vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIa recombinate, se incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, como vectores adecuados, se 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 procarióticas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión en mamíferos contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucarióticas que se expresan en células eucarióticas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión en mamíferos adecuados para transfección en células eucarióticas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos en células tanto procarióticas como eucarióticas. Alternativamente, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP t p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluyendo retrovíricos) a continuación en la descripción de sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como eucarióticas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular*

Cloning A Laboratory Manual, 3^a Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Como ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus, se 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 pBlueBac III que contiene β -gal).

En una realización preferida, se diseñará un vector para producción de los polipéptidos ActRIIa en cuestión en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será aparente, las construcciones génicas en cuestión pueden ser usadas para provocar la expresión de los polipéptidos ActRIIa en cuestión en células propagadas en cultivo, v.g., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

Esta descripción también se relaciona con una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (v.g., SEC ID N°: 4 ó 5) para uno o más de los polipéptidos ActRIIa en cuestión. La célula huésped puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, se puede expresar un polipéptido ActRIIa de la invención en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (v.g., usando un sistema de expresión de baculovirus), levaduras o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas son conocidas para los expertos en la técnica.

En consecuencia, la presente invención se relaciona también con métodos de producción de los polipéptidos ActRIIa en cuestión. Por ejemplo, se puede cultivar una célula huésped transfectada con un vector de

expresión codificante de un polipéptido ActRIIa en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRIIa. El polipéptido ActRIIa puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIa. Alternativamente, se puede retener el polipéptido ActRIIa citoplásmicamente o en una fracción de membrana y se pueden recoger las células, lisarlas y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye las células huésped, el medio y otros subproductos. Los medios adecuados para cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos ActRIIa en cuestión pueden ser aislados del medio de cultivo celular, de las células huésped o de ambos, usando técnicas conocidas en el campo de la purificación de proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración por gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epitopos particulares de los polipéptidos ActRIIa y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ActRIIa (v.g., se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIa-Fc). En una realización preferida, el polipéptido ActRIIa es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferida, se consigue la purificación por una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía con proteína A, cromatografía con sefarosa Q, cromatografía con fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. Se podría completar la purificación con filtración vírica e intercambio de tampón. Como se demuestra aquí, se purificó la proteína ActRIIa-hFc a una pureza >98% según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según se determinó por SDS PAGE. Este nivel de pureza era suficiente

para conseguir efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otra realización, un gen de fusión
 5 codificante de una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia poli(His)/sitio de escisión de enterokinasa en el extremo N de la porción deseada del polipéptido ActRIIa recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por
 10 cromatografía de afinidad usando una resina metálica de Ni^{2+} . Se puede retirar luego la secuencia líder de purificación por tratamiento con enterokinasa para obtener el polipéptido ActRIIa purificado (v.g., véanse Hochuli y col., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; y Janknecht y
 15 col., *PNAS USA* 88: 8972).

Las técnicas para producir genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, se realiza la unión de diversos fragmentos de ADN codificantes de diferentes secuencias polipeptídicas según técnicas convencionales,
 20 empleando extremos romos o escalonados para ligación, digestión con enzimas de restricción para obtener extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligación enzimática. En otra
 25 realización, el gen de fusión puede ser sintetizado por técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se puede realizar una amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes
 30 complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden hibridarse luego para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

35 4. Antagonistas alternativos de activina y ActRIIa
 Los datos aquí presentados demuestran que los

antagonistas de la señalización de activina-ActRIIa pueden ser usados para promover el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Aunque los polipéptidos ActRIIa solubles, y particularmente ActRIIa-Fc, son antagonistas preferidos, y aunque dichos antagonistas pueden afectar al hueso por un mecanismo distinto del antagonismo de la activina (v.g., la inhibición de la activina puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de moléculas, incluyendo, quizá, otros miembros de la superfamilia TGF-beta, y dicha inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado sobre el hueso), se espera que otros tipos de antagonistas de activina-ActRIIa sean útiles, incluyendo anticuerpos anti-activina (v.g., A, B, C o E), anticuerpos anti-ActRIIa, antisentido, ARNi o ácidos nucleicos de ribozimas que inhiben la producción de ActRIIa y otros inhibidores de la activina o de ActRIIa, particularmente los que destruyen la unión activina-ActRIIa.

Se puede usar un anticuerpo que reaccione específicamente con un polipéptido ActRIIa (v.g., un polipéptido ActRIIa soluble) y que se una competitivamente con ligando al polipéptido ActRIIa o inhiba de algún otro modo la señalización mediada por ActRIIa como antagonista de las actividades de los polipéptidos ActRIIa. De igual modo, se puede usar como antagonista un anticuerpo que reaccione específicamente con un polipéptido de activina A y que destruya la unión de ActRIIa.

Utilizando inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIa o de un polipéptido de activina, anti-se pueden preparar antisueros o anticuerpos monoclonales anti-proteína/anti-péptido por protocolos estándar (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Se puede inmunizar un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, con una forma inmunógena del polipéptido ActRIIa, un fragmento antigénico que sea capaz de provocar una

respuesta de anticuerpos o una proteína de fusión. Como técnicas para conferir inmunogenicidad sobre una proteína o péptido, se incluyen la conjugación a soportes u otras técnicas bien conocidas en este campo. Se puede administrar
 5 una porción inmunógena de un polipéptido ActRIIa o activina en presencia de adyuvante. Se puede monitorizar el progreso de la inmunización por detección de los títulos de anticuerpo en plasma o suero. Se pueden usar un ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como
 10 antígeno para valorar los niveles de anticuerpos.

Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido ActRIIa, se puede obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir
 15 anticuerpos monoclonales, se pueden recoger células productoras de anticuerpo (linfocitos) de un animal inmunizado y fusionarlas por procedimientos de fusión de células somáticas estándar con células inmortalizantes, tales como células de mieloma, para obtener células de
 20 hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en este campo e incluyen, por ejemplo, la técnica de los hibridomas (originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (1975), Nature, 256: 495-497), la técnica de los hibridomas de células B humanas (Kozbar y col. (1983), Immunology Today,
 25 4: 72) y la técnica de los hibridomas EBV, para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Se pueden cribar las células de hibridoma inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos que
 30 reaccionan específicamente con un polipéptido ActRIIa y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que contiene dichas células de hibridoma.

El término "anticuerpo", tal como se usa aquí, pretende incluir fragmentos del mismo que también
 35 reaccionan específicamente con un polipéptido en cuestión. Se pueden fragmentos anticuerpos usando técnicas

convencionales y cribar los fragmentos en cuanto a su utilidad del mismo modo que como se ha descrito antes para anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos $F(ab)_2$ tratando el anticuerpo con pepsina. Se
 5 puede tratar el fragmento $F(ab)_2$ resultante para reducir los puentes disulfuro y producir fragmentos Fab. El anticuerpo de la presente invención pretende también incluir moléculas biespecíficas de una sola cadena quiméricas, humanizadas y totalmente humanas con afinidad
 10 para un polipéptido ActRIIa o activina conferidas por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede además incluir un marcaje unido al mismo y capaz de ser detectado (v.g., el marcaje puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor
 15 enzimático).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, cuyo término ampara cualquier anticuerpo generado en parte por técnicas de biología molecular, incluyendo anticuerpos injertados con CDR o
 20 quiméricos, anticuerpos humanos u otros anticuerpos reunidos a partir de dominios de anticuerpos seleccionados de una librería, anticuerpos de una sola cadena y anticuerpos de un solo dominio (v.g., proteínas V_H humanas o proteínas V_{HH} de camélidos). En ciertas realizaciones, un
 25 anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal y, en ciertas realizaciones, la invención hace disponibles métodos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActRIIa o a un polipéptido
 30 de activina puede consistir en administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que contiene el polipéptido antigénico efectivo para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpos (v.g., células del bazo) del ratón y fusionar
 35 las células productoras de anticuerpo con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos

y estudiar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, se puede propagar un hibridoma en un cultivo
 5 celular, eventualmente 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 ser purificado a partir del cultivo celular.

10 El adjetivo "específicamente reactivo con", tal como se usa en relación a un anticuerpo, pretende significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (v.g., un polipéptido ActRIIa) y otros
 15 antígenos que no son de interés, es decir, que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un
 20 mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales tienen generalmente una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar con efectividad entre los antígenos deseados y polipéptidos que presentan reacción cruzada. Una característica que
 25 influye en la especificidad de una interacción anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque se puede alcanzar la especificidad deseada con un rango de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o
 30 menos. Dada la extraordinariamente estrecha unión entre activina y ActRIIa, se espera que un anticuerpo neutralizante anti-activina o anti-ActRIIa tenga, en general, una constante de disociación de 10^{-10} o menos.

35 Además, las técnicas usadas para cribar anticuerpos para identificar un anticuerpo deseable pueden

influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unión a un antígeno en solución, puede ser deseable estudiar la unión en solución. Se dispone de una variedad de técnicas diferentes para estudiar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia plasmónica superficial (v.g., el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos en sandwich (v.g., el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), western blots, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

Como ejemplos de categorías de compuestos de ácidos nucleicos que son antagonistas de la activina o de la ActRIIa, se incluyen ácidos nucleicos antisentido, construcciones de ARNi y construcciones de ácidos nucleicos catalíticas. Un compuesto de ácido nucleico puede ser de una o de doble hebra. Un compuesto de doble hebra puede también incluir regiones sobresalientes o de no complementariedad, donde una u otra hebra es de hélice sencilla. Un compuesto de una sola hebra puede incluir regiones de autocomplementariedad, lo que significa que el compuesto forma una así llamada estructura de "horquilla" o de "tronco de bucle", con una región de estructura doble-helicoidal. Un compuesto de ácido nucleico puede tener una secuencia nucleotídica complementaria a una región consistente en nomás de 1.000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 30, 25, 22, 20 ó 18 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de ActRIIa de longitud completa o de la secuencia de ácido nucleico de la activina βA o de la activina βB . La región de complementariedad será preferiblemente de al menos 8 nucleótidos y eventualmente de al menos 10 o de al menos 15 nucleótidos, y eventualmente de entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede caer dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no

codificante del transcripto de interés, tal como la porción de secuencia codificante. En general, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y eventualmente la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para uso como antisentido), ARN o un híbrido ARN:ADN. Cualquier hebra puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden ser fácilmente clasificadas como ADN o ARN. De igual modo, un compuesto de doble hebra puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN y cualquier hebra puede incluir también una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden ser fácilmente clasificadas como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, incluyendo una o más modificaciones en el esqueleto (la porción de azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo las uniones internucleotídicas) o en la porción de las bases (la porción de purinas o pirimidinas de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico antisentido tendrá preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y contendrá con frecuencia una o más modificaciones para mejorar características tales como la estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar donde el compuesto tiene probabilidad de ser suministrado, tal como el estómago en el caso de compuestos administrados por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de una construcción de ARNi, la hebra complementaria al transcripto de interés será generalmente ARN o modificaciones de éste. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción dúplex de la construcción de ARNi en "horquilla" de doble hebra o de una sola hebra tendrá preferiblemente una longitud de 18 a 40 nucleótidos y eventualmente de aproximadamente 21 a 23

nucleótidos, en la medida en que sirva como sustrato Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y pueden también contener formas modificadas. Los compuestos de ácidos nucleicos pueden inhibir la expresión del objetivo en aproximadamente un 50%, 75%, 90% o más cuando contactan con las células en condiciones fisiológicas y a una concentración en la que un control sin sentido o con sentido tiene poco o ningún efecto. Las concentraciones preferidas para estudiar el efecto de los compuestos de ácidos nucleicos son 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácidos nucleicos pueden ser también estudiados en cuanto a los efectos sobre, por ejemplo, el crecimiento y la mineralización del hueso.

5. Ensayos de cribado

En ciertos aspectos, la presente invención se relaciona con el uso de polipéptidos ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa solubles) y de polipéptidos de activina para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la ruta de señalización activina-ActRIIa. Los compuestos identificados por este cribado pueden ser estudiados para valorar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización del hueso *in vitro*. Eventualmente, estos compuestos pueden ser además estudiados en modelos animales para valorar su capacidad para modular el crecimiento tisular *in vivo*.

Existen numerosas aproximaciones para el cribado de agentes terapéuticos para modular el crecimiento tisular abordando los polipéptidos de activina y ActRIIa. En ciertas realizaciones, se puede realizar el cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban los efectos mediados por activina o ActRIIa sobre el hueso. En ciertas realizaciones, el ensayo es realizado para cribar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. Alternativamente, el ensayo puede ser usado para

identificar compuestos que aumentan la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. En otra realización, los compuestos pueden ser identificados por su capacidad para interaccionar con un polipéptido de activina o ActRIIa.

5 Bastarán una variedad de formatos de ensayo y, a la luz de la presente descripción, aquéllos no expresamente aquí descritos serán, no obstante, comprendidos por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica. Tal como se describe aquí, los compuestos
10 (agentes) de ensayo de la invención pueden ser creados por cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas naturales sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Se pueden producir los compuestos (agentes) que se han de estudiar en
15 cuanto a su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento de tejidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (v.g., productos naturales), químicamente (v.g., pequeñas moléculas, incluyendo peptidomiméticos) o recombinantemente. Los
20 compuestos de ensayo contemplados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas no peptidílicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácidos nucleicos. En una realización específica, el agente de ensayo es una pequeña molécula
25 orgánica que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 daltons.

Los compuestos de ensayo de la invención pueden ser presentados como entidades simples discretas, o presentados en librerías de mayor complejidad, tales como
30 las producidas por química combinatoria. Estas librerías pueden incluir, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser en forma aislada o
35 como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales del cribado. Eventualmente, los compuestos pueden

ser derivatizados con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Como ejemplos no limitativos de grupos derivatizantes, se incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), entrecruzantes fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos que estudian librerías de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos que sobreviven en un período de tiempo dado. Con frecuencia se prefieren ensayos realizados en sistemas libres de células, tal como los que derivan de proteínas purificadas o semipurificadas, como cribados "primarios", en el sentido de que pueden ser generados para permitir el rápido desarrollo y la relativamente fácil detección de una alteración en un blanco molecular mediada por un compuesto de ensayo. Más aún, se pueden ignorar, en general, los efectos de la toxicidad celular o de la biodisponibilidad del compuesto de ensayo en el sistema *in vitro*, siendo enfocado el ensayo en lugar de ello primariamente hacia el efecto del fármaco sobre el blanco molecular tal como puede quedar manifiesto por una alteración en la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIa y la activina.

Como mera ilustración, en un ejemplo de ensayo de cribado de la presente invención, se pone en contacto el compuesto de interés con un polipéptido ActRIIa aislado y purificado capaz ordinariamente de unirse a la activina. Se añade entonces a la mezcla del compuesto y del polipéptido ActRIIa una composición que contiene un ligando ActRIIa. La detección y la cuantificación de los complejos ActRIIa/activina proporcionan un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIa y la

activina. Se puede valorar la eficacia del compuesto generando curvas dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos usando varias concentraciones del compuesto de ensayo. Más aún, también se puede realizar un ensayo de control para obtener una línea basal para comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActRIIa y se cuantifica la formación del complejo ActRIIa/activina en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, se puede variar el orden de mezcla de los reactivos y que pueden mezclarse simultáneamente. Más aún, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para obtener un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIa y la activina puede ser detectada por una variedad de técnicas. Por ejemplo, se puede cuantificar la modulación de la formación de complejos usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como polipéptido ActRIIa o activina radiomarcados (v.g., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), fluorescentemente marcados (v.g., FITC) o enzimáticamente marcados, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla el uso de ensayos de polarización de la fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, directa o indirectamente, del grado de interacción entre un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente EE.UU. N° 5.677.196), resonancia plasmónica superficial (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas realizaciones de la invención.

Más aún, la presente invención contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que destruyen o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, la Patente EE.UU. N° 5.283.317; Zervos y col. (1993), Cell 72: 223-232; Madura y col. (1993), J Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel y col. (1993), Biotechniques 14: 920-924; y Iwabuchi y col. (1993), Oncogene 8: 1693-1696).

En una realización específica, la presente invención contempla el uso de sistemas de dos híbridos invertidos para identificar compuestos (v.g., pequeñas moléculas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal y Legrain (1999), Nucleic Acids Res 27: 919-29; Vidal y Legrain (1999), Trends Biotechnol 17: 374-81; y las Patentes EE.UU. N° 5.525.490, 5.955.280 y 5.965.368.

En ciertas realizaciones, los compuestos en cuestión son identificados por su capacidad para interaccionar con un polipéptido ActRIIa o activina de la invención. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIa o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede ser identificada a nivel proteico usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo fotoentrecruzamiento, unión de ligandos radiomarcados y cromatografía de afinidad (Jakoby WB y col., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden ser cribados en un ensayo basado en el mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de activina o ActRIIa. Éste puede incluir un fenómeno de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen codificante de un polipéptido de activina o ActRIIa puede ser transfectado con un sistema informador (v.g., β -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y cribado frente a la librería, preferiblemente por un

cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la librería. Se pueden emplear otros ensayos de unión basados en el mecanismo, por ejemplo ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión
5 pueden ser llevados a cabo con el blanco fijado en un pocillo, perla o chip o capturado por un anticuerpo inmovilizado o resuelto por electroforesis capilar. Se pueden detectar los compuestos unidos normalmente usando colorimetría o fluorescencia o resonancia plasmónica
10 superficial.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos y agentes para modular (estimular o inhibir) la formación del hueso y aumentar la masa ósea. Por lo tanto, se puede estudiar cualquier compuesto
15 identificado en células enteras o tejidos, *in vitro* o *in vivo*, para confirmar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización del hueso. Se pueden utilizar diversos métodos conocidos en la técnica con este fin.

20 Por ejemplo, se puede determinar el efecto de los polipéptidos ActRIIa o activina o de los compuestos de ensayo sobre el crecimiento del hueso o del cartílago midiendo la inducción de Msx2 o la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos en ensayos
25 basados en células (véanse, v.g., Daluiski y col., Nat Genet. 2001, 27(1): 84-8; Hino y col., Front Biosci. 2004, 9: 1520-9). Otro ejemplo de ensayos basados en células incluye el análisis de la actividad osteogénica de los presentes polipéptidos ActRIIa o activina y de los
30 compuestos de ensayo en células progenitoras mesenquimales y osteoblásticas. Para ilustrar, se pueden construir adenovirus recombinantes que expresan un polipéptido de activina o ActRIIa para infectar células C3H10T1/2 progenitoras mesenquimales pluripotentes, células C2C12
35 preosteoblásticas y células TE-85 osteoblásticas. Se determina entonces la actividad osteogénica midiendo la

inducción de fosfatasa alcalina, de osteocalcina y de la mineralización de la matriz (véase, v.g., Cheng y col., J Bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52).

La presente invención también contempla ensayos *in vivo* para medir el crecimiento del hueso o del cartílago. Por ejemplo, Namkung-Matthai y col., Bone, 28: 80-86 (2001), describen un modelo de osteoporosis en rata en el que se estudia la reparación ósea durante el período inicial después de una fractura. Kubo y col., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68: 197-202 (1999), también describen un modelo de osteoporosis en rata en el que se estudia la reparación ósea durante el período tardío después de una fractura. Andersson y col., J. Endocrinol. 170: 529-537, describen un modelo de osteoporosis en ratón en el que se someten los ratones a ovariectomía, que hace que los ratones pierdan un contenido mineral óseo y una densidad mineral ósea substanciales, perdiendo el hueso trabecular aproximadamente un 50% de la densidad mineral ósea. Se podría aumentar la densidad ósea en los ratones ovariectomizados por administración de factores tales como la hormona paratiroidea. En ciertos aspectos, la presente invención hace uso de ensayos de curación de fracturas conocidos en la técnica. Estos ensayos incluyen la técnica de fractura, el análisis histológico y el análisis bioquímico, que se describen en, por ejemplo, la Patente EE.UU. N° 6.521.750, aquí incorporada como referencia en su totalidad por su descripción de protocolos experimentales para causar fracturas, así como para su alcance, y del proceso de reparación.

30 6. Ejemplos de usos terapéuticos

En ciertas realizaciones, se pueden usar los antagonistas activina-ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa) de la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada a lesión ósea, ya sea,
35 v.g., por rotura, pérdida o desmineralización. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de

tratamiento o de prevención de la lesión ósea en un individuo que lo necesite por administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista activina-ActRIIa, particularmente un polipéptido ActRIIa.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para promover el crecimiento o la mineralización del hueso en un individuo que lo necesite por administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista activina-

10 ActRIIa, particularmente de un polipéptido ActRIIa. Estos métodos están encauzados preferiblemente a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más preferiblemente de humanos. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona el uso de antagonistas activina-

15 ActRIIa (particularmente de polipéptidos ActRIIa solubles y anticuerpos neutralizantes dirigidos a activina o ActRIIa) para el tratamiento de trastornos asociados a una baja densidad ósea o a una menor resistencia del hueso.

Tal como se usa aquí, un terapéutico que

20 "previene" un trastorno o condición se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la incidencia del trastorno o condición en la muestra tratada en relación a una muestra control no tratada, o que retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del

25 trastorno o condición en relación a la muestra control no tratada. El término "tratamiento", tal como se usa aquí, incluye la profilaxis de la condición nombrada o el mejoramiento o la eliminación de la condición una vez se ha establecido. En cualquier caso, se puede discernir entre

30 prevención o tratamiento en el tratamiento proporcionado por un médico y el resultado pretendido de la administración del agente terapéutico.

La descripción proporciona métodos de inducción de la formación de hueso y/o cartílago, de prevención de la

35 pérdida ósea, de aumento de la mineralización ósea o de prevención de la desmineralización del hueso. Por ejemplo,

los antagonistas activina-ActRIIa en cuestión tienen aplicación en el tratamiento de la osteoporosis y en la curación de fracturas óseas y defectos del cartílago en humanos y otros animales. Los polipéptidos ActRIIa o
5 activina pueden ser útiles en pacientes diagnosticados con baja densidad ósea subclínica, como medida protectora contra el desarrollo de la osteoporosis.

En una realización específica, los métodos y composiciones de la presente invención pueden hallar
10 utilidad médica en la curación de fracturas óseas y defectos del cartílago en humanos y otros animales. Los presentes métodos y composiciones pueden tener también un uso profiláctico en la reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas y también en la mejor fijación de
15 articulaciones artificiales. La formación de hueso de novo inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismos o inducidos por resección oncológica y es también útil en cirugía plástica cosmética. En ciertos
20 casos, los presentes antagonistas activina-ActRIIa pueden proporcionar un ambiente para atraer a las células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de las células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitoras de las células formadoras de hueso. Los
25 antagonistas activina-ActRIIa de la invención pueden ser útiles también en el tratamiento de la osteoporosis.

Los métodos y composiciones de la invención pueden ser aplicados a condiciones caracterizadas por pérdida ósea o que la causan, tales como la osteoporosis
30 (incluyendo la osteoporosis secundaria), el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Cushing, la enfermedad de Paget, la tirotoxicosis, el estado diarreico o malabsorción crónicos, la acidosis tubular renal o la anorexia nerviosa.

35 La osteoporosis puede estar causada por, o asociarse a, varios factores. Ser hembra, particularmente

una hembra posmenopáusica, tener un bajo peso corporal y llevar un estilo de vida sedentario son todos factores de riesgo para la osteoporosis (pérdida de densidad mineral del hueso, que conduce a riesgo de fracturas). Las personas

5 que tienen cualquiera de los siguientes perfiles pueden ser candidatas al tratamiento con un antagonista ActRIIa: una mujer posmenopáusica y que no toma estrógenos u otra terapia de reemplazo hormonal; una persona con una historia personal o materna de fractura de cadera o de tabaquismo;

10 una mujer posmenopáusica que es alta (por encima de 5 pies y 7 pulgadas) o delgada (menos de 125 libras); un hombre con condiciones clínicas asociadas a pérdida ósea; una persona que utiliza medicaciones que se sabe causan pérdida ósea, incluyendo corticosteroides tales como Prednisone™,

15 diversas medicaciones anticonvulsivantes tales como Dilantin™ y ciertos barbituratos, o fármacos de reemplazo tiroideo a altas dosis; una persona que tiene diabetes de tipo 1, enfermedad hepática, enfermedad renal o una historia familiar de osteoporosis; una persona que tiene

20 una alta renovación ósea (v.g., excesivo colágeno en muestras de orina); una persona con una condición tiroidea, tal como hipertiroidismo; una persona que ha experimentado una fractura después de un tan sólo un traumatismo leve; una persona que ha tenido evidencia por rayos x de fractura

25 vertebral u otros signos de osteoporosis.

Como se ha indicado antes, la osteoporosis puede ser también surgir como una condición asociada a otro trastorno o por el uso de ciertas medicaciones. La osteoporosis resultante de fármacos o de otra condición

30 médica es conocida como osteoporosis secundaria. En una condición conocida como la enfermedad de Cushing, el exceso de cantidad de cortisol producida por el organismo da lugar a osteoporosis y fracturas. Las medicaciones más comunes asociadas a la osteoporosis secundaria son los

35 corticosteroides, una clase de fármacos que actúan como el cortisol, una hormona producida de forma natural por las

glándulas adrenales. Aunque se necesitan niveles adecuados de hormonas tiroideas (que son producidas por la glándula tiroidea) para el desarrollo del esqueleto, un exceso de hormona tiroidea puede reducir la masa ósea a lo largo del tiempo. Los antácidos que contienen alúmina pueden conducir a pérdida ósea cuando se toman en dosis altas por personas con problemas renales, particularmente las que sufren diálisis. Otras medicaciones que causan osteoporosis secundaria incluyen fenitoína (Dilantin) y barbituratos, que se usan para prevenir las convulsiones; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), un fármaco para algunas formas de artritis, cáncer y trastornos inmunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), un fármaco usado para tratar algunas enfermedades autoinmunes y para suprimir el sistema inmune en pacientes de trasplantes de órganos; agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), usados para tratar el cáncer de próstata y la endometriosis; heparina (Calciparine, Liquaemin), una medicación anticoagulante; y colestiramina (Questran) y colestipol (Colestid), usados para tratar el colesterol alto. La pérdida ósea resultante de la terapia contra el cáncer está ampliamente reconocida y se le denomina pérdida ósea inducida por terapia contra el cáncer (CTIBL). Las metástasis óseas pueden crear cavidades en el hueso que pueden ser corregidas por tratamiento con antagonistas activina-ActRIIa.

En una realización preferida, los antagonistas activina-ActRIIa, particularmente una ActRIIa soluble, aquí descritos pueden ser usados en pacientes de cáncer. Los pacientes que tienen ciertos tumores (v.g., de próstata, de mama, mieloma múltiple o cualquier otro tumor que cause hiperparatiroidismo) se hallan en alto riesgo de pérdida ósea debido a pérdida ósea inducida por el tumor, así como a metástasis óseas y agentes terapéuticos. Dichos pacientes pueden ser tratados con antagonistas activina-ActRIIa incluso en ausencia de evidencia de pérdida ósea o de

metástasis óseas. Los pacientes pueden ser también monitorizados en cuanto a evidencia de pérdida ósea o de metástasis óseas y pueden ser tratados con antagonistas activina-ActRIIa en caso de que los indicadores sugieran un mayor riesgo. En general, se emplean barridos DEXA para valorar los cambios en la densidad ósea, mientras que se pueden usar indicadores de remodelación ósea para valorar la probabilidad de metástasis óseas. Se pueden monitorizar los marcadores séricos. La fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP) es una enzima que está presente en los osteoblastos. Los niveles en sangre de BSAP aumentan en pacientes con metástasis ósea y otras condiciones que dan lugar a una mayor remodelación ósea. La osteocalcina y los péptidos procógeno se asocian también a la formación del hueso y a metástasis óseas. Se han detectado aumentos en la BSAP en pacientes con metástasis óseas causadas por el cáncer de próstata, y en menor grado en metástasis óseas por cáncer de mama. Los niveles de Proteína-7 Morfogénica Ósea (BMP-7) están altos en el cáncer de próstata que ha metastatizado al hueso, pero no en metástasis óseas debidas a cáncer de vejiga, piel, hígado o de pulmón. El telopéptido carboxi-terminal de tipo I (ICTP) es un entrecruzamiento que se encuentra en el colágeno que se forma durante la resorción del hueso. Como el hueso está siendo constantemente destruido y formado de nuevo, el ICTP se encontrará por todo el organismo. Sin embargo, en el sitio de la metástasis ósea, el nivel será significativamente mayor que en un área de hueso normal. Se ha encontrado ICTP en altos niveles en metástasis ósea debida a cáncer de próstata, pulmón y mama. Otro entrecruzamiento del colágeno, el telopéptido N-terminal de tipo I (NTx), se produce junto con el ICTP durante la renovación ósea. La cantidad de NTx aumenta en metástasis óseas causadas por muchos tipos diferentes de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, próstata y mama. Además, los niveles de NTx aumentan con la progresión de la

metástasis ósea. Por lo tanto, este marcador puede ser usado para detectar la metástasis, así como para medir el grado de la enfermedad. Otros marcadores de resorción incluyen piridinolina y desoxipiridinolina. Cualquier
5 aumento en los marcadores de resorción o en los marcadores de metástasis óseas indica la necesidad de terapia con antagonistas activina-ActRIIa en un paciente.

Los antagonistas activina-ActRIIa pueden ser administrados conjuntamente con otros agentes
10 farmacéuticos. Se puede realizar la administración conjunta por administración de una sola coformulación, por administración simultánea o por administración en momentos separados. Los antagonistas activina-ActRIIa pueden ser particularmente ventajosos si se administran con otros
15 agentes activos en el hueso. Un paciente puede beneficiarse de recibir un antagonista activina-ActRIIa y de tomar conjuntamente suplementos de calcio, vitamina D, ejercicio apropiado y/o, en algunos casos, otra medicación. Como ejemplos de otras medicaciones, se incluyen bisfosfonatos
20 (alendronato, ibandronato y risedronato), calcitonina, estrógenos, hormona paratiroidea y raloxifeno. Los bisfosfonatos (alendronato, ibandronato y risedronato), la calcitonina, los estrógenos y el raloxifeno afectan al ciclo de remodelación del hueso y se clasifican como
25 medicaciones antiresortivas. La remodelación del hueso consiste en dos fases distintas: la resorción del hueso y la formación del hueso. Las medicaciones antiresortivas enlentecen o detienen la porción de resorción del hueso del ciclo de remodelación ósea, pero no enlentecen la porción
30 de formación del hueso del ciclo. Como resultado, continúa una nueva formación a una mayor velocidad que la resorción ósea y la densidad del hueso puede aumentar a lo largo del tiempo. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, aumenta la velocidad de formación del hueso en el ciclo de
35 remodelación ósea. El alendronato está aprobado tanto para la prevención (5 mg al día o 35 mg una vez por semana) como

para el tratamiento (10 mg al día o 70 mg una vez por semana) de la osteoporosis posmenopáusica. El alendronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna, muñeca y cadera. El

5 alendronato está también aprobado para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en hombres y mujeres como resultado del uso a largo plazo de estas medicaciones (es decir, prednisona y cortisona) y para el tratamiento de la osteoporosis en hombres. El alendronato

10 más vitamina D está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (70 mg una vez por semana más vitamina D) y para el tratamiento para mejorar la masa ósea en hombres con osteoporosis. El ibandronato está aprobado para la prevención y el tratamiento la

15 osteoporosis posmenopáusica. Tomado como una píldora una vez al mes (150 mg), el ibandronato debe ser tomado el mismo día cada mes. El ibandronato reduce la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. El risedronato está aprobado para la prevención y

20 el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Tomado diariamente (dosis de 5 mg) o semanalmente (dosis de 35 mg o dosis de 35 mg con calcio), el risedronato enlentece la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna y no espinales. El risedronato está

25 también aprobado para uso por hombres y mujeres para prevenir y/o tratar la osteoporosis inducida por glucocorticoides que resulta del uso a largo plazo de estas medicaciones (es decir, prednisona o cortisona). La calcitonina es una hormona natural implicada en la

30 regulación del calcio y en el metabolismo del hueso. En mujeres que han pasado más de 5 años desde la menopausia, la calcitonina enlentece la pérdida ósea, aumenta la densidad ósea espinal y puede aliviar el dolor asociado a las fracturas óseas. La calcitonina reduce el riesgo de

35 fracturas de columna. La calcitonina está disponible como una inyección (50-100 UI diarias) o spray nasal (200 UI

diarias). La terapia estrogénica (TE)/terapia hormonal (TH) está aprobada para la prevención de la osteoporosis. La TE ha mostrado reducir la pérdida ósea, aumentar la densidad ósea tanto en la columna como en la cadera y reducir el riesgo de fracturas de cadera y columna en mujeres posmenopáusicas. La TE es administrada más comúnmente en forma de una píldora o de un parche cutáneo que suministra una baja dosis de aproximadamente 0,3 mg diarios o una dosis estándar de aproximadamente 0,625 mg diarios y es efectiva incluso cuando se inicia después de los 70 años de edad. Cuando se toma el estrógeno solo, puede aumentar el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer del revestimiento uterino (cáncer endometrial). Para eliminar este riesgo, los cuidadores de la salud prescriben la hormona progestina en combinación con estrógeno (terapia de reemplazo hormonal o TH) para aquellas mujeres que tienen un útero intacto. La TE/TH alivia los síntomas de la menopausia y ha mostrado tener un efecto beneficioso sobre la salud del hueso. Los efectos colaterales pueden incluir sangrado vaginal, sensibilidad de la mama, alteraciones del humor y enfermedad de la vesícula biliar. El raloxifeno, a 60 mg al día, está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Es de una clase de fármacos llamados Moduladores de los Receptores de Estrógenos Selectivos (SERM) que han sido desarrollados para aportar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin sus inconvenientes potenciales. El raloxifeno aumenta la masa ósea y reduce el riesgo de fracturas de columna. Aún no se dispone de datos para demostrar que el raloxifeno puede reducir el riesgo de fracturas de cadera y otras fracturas no espinales. La teriparatida, una forma de hormona paratiroidea, está aprobada para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y en hombres que se hallan en un alto riesgo de fractura. Esta medicación estimula la formación de nuevo hueso y aumenta significativamente la densidad mineral del hueso. En

mujeres posmenopáusicas, se observó reducción de fracturas en la columna, la cadera, el pie, las costillas y la muñeca. En hombres, se observó reducción de fracturas en la columna, pero había datos insuficientes para evaluar la reducción de fracturas en otros lugares. La teriparatida es autoadministrada como una inyección diaria durante hasta 24 meses.

7. Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los antagonistas activina-ActRIIa (v.g., polipéptidos ActRIIa) de la presente invención están formulados con un soporte farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido ActRIIa solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los presentes compuestos pueden ser formulados para administración en cualquier forma conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

En ciertas realizaciones, el método terapéutico de la invención incluye la administración de la composición sistémica o localmente como implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención está, por supuesto, en forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Se pueden administrar agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas ActRIIa, y que también pueden ser eventualmente incluidos en la composición antes descrita, simultánea o secuencialmente con los presentes compuestos (v.g., polipéptidos ActRIIa) en los métodos de la invención.

Típicamente, los antagonistas ActRIIa serán administrados parenteralmente. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden incluir uno o más polipéptidos ActRIIa en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables o polvos estériles, que pueden ser reconstituídos en soluciones o

dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor al que se destinan, o
5 agentes suspensores o espesantes. Como ejemplos de soportes acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la invención, se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas
10 adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando materiales de revestimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula
15 requerido en el caso de las dispersiones y usando surfactantes.

Además, la composición puede ser encapsulada o inyectada en una forma para administración a un sitio tisular de destino (v.g., hueso). En ciertas realizaciones,
20 las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (v.g., polipéptidos ActRIIa) a un sitio tisular de destino (v.g., hueso), que proporcione una estructura para el tejido en desarrollo y que sea
25 óptimamente capaz de reabsorberse en el organismo. Por ejemplo, la matriz puede permitir la liberación lenta de los polipéptidos ActRIIa. Dichas matrices pueden estar formadas de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

30 La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de interfase. La aplicación particular de las presentes composiciones definirá la formulación apropiada.
35 Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxapatito,

ácido poliláctico y polianhidridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices están constituidas
 5 por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos o otras cerámicas. Las matrices pueden estar constituidas por
 10 combinaciones de cualquiera de los tipos antes mencionados de material, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden ser alteradas en su composición, tal como en aluminato-fosfato-de calcio, y en el procesado para alterar el tamaño
 15 de poro, el tamaño de partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención pueden ser para administración oral, v.g., en forma de cápsulas, cachets, píldoras, tabletas, pastillas
 20 (usando una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o de agua-en-aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base
 25 inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como lavados bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. También se puede administrar un agente como bolo, electuario o pasta.

30 En las formas sólidas de dosificación para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables, tales como
 35 citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenanates o extensores, tales como

almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes hidratantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y sus mezclas; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden incluir también agentes tamponantes. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenas en cápsulas de gelatina blanda y dura rellenas usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas líquidas de dosificación para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas líquidas de dosificación pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsores, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos y de sorbitán y sus mezclas. Además de

diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsores y suspensores y agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

- 5 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes suspensores tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol, ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y sus mezclas.

- 10 Las composiciones de la invención pueden también contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsores y agentes dispersantes. Se puede asegurar la prevención de la acción de los microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, se puede conseguir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por medio de la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

- 25 Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico asistente considerando diversos factores que modifican la acción de los presentes compuestos de la invención (v.g., polipéptidos ActRIIa). Los diversos factores incluyen, aunque sin limitación, la cantidad de peso óseo que se desee formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio de la lesión ósea, la condición del hueso lesionado, la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a la pérdida ósea, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Eventualmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición.

La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final puede también afectar a la dosificación. Se puede monitorizar el progreso por valoración periódica del crecimiento y/o la reparación del hueso, por ejemplo
 5 por rayos X (incluyendo DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

Experimentos con ratones han demostrado que los efectos de ActRIIa-Fc sobre el hueso son detectables cuando se dosifica el compuesto a intervalos y en cantidades
 10 suficientes para conseguir concentraciones séricas de 0,2 µg/kg o superiores y son deseables niveles séricos de 1 µg/kg o 2 µg/kg o superiores para conseguir efectos significativos sobre la densidad y resistencia del hueso. Aunque no existen indicaciones de que dosis superiores de
 15 ActRIIa-Fc sean indeseables debido a efectos colaterales, se pueden diseñar los regímenes de dosificación para alcanzar concentraciones séricas de entre 0,2 y 15 µg/kg, y eventualmente de entre 1 y 5 µg/kg. En humanos, se pueden conseguir niveles séricos de 0,2 µg/kg con una sola dosis
 20 de 0,1 mg/kg o superior y se pueden conseguir niveles séricos de 1 µg/kg con una sola dosis de 0,3 mg/kg o superior. La vida media en suero observada de la molécula es de entre aproximadamente 20 y 30 días, substancialmente mayor que la mayoría de las proteínas de fusión Fc, y se
 25 puede conseguir de este modo un nivel sérico efectivo mantenido, por ejemplo, por dosificación con 0,2-0,4 mg/kg en una base semanal o bisemanal, o se pueden usar dosis superiores con intervalos más largos entre dosificaciones. Por ejemplo, se podrían usar dosis de 1-3 mg/kg en una base
 30 mensual y bimensual, y el efecto sobre el hueso puede ser lo suficientemente duradero como para que la dosificación sea necesaria sólo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses.

En ciertas realizaciones, la presente invención
 35 proporciona también terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos ActRIIa. Dicha terapia conseguiría su

efecto terapéutico por introducción de las secuencias polinucleotídicas ActRIIa en células o tejidos que tienen los trastornos antes enumerados. Se puede conseguir la administración de secuencias polinucleotídicas ActRIIa usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Es preferido para la administración terapéutica de secuencias polinucleotídicas ActRIIa el uso de liposomas dirigidos.

Diversos vectores víricos que pueden ser utilizados para terapia génica como aquí se enseña incluyen adenovirus, virus herpes, vaccinia o, preferiblemente, un virus ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Como ejemplos de vectores retrovíricos en los que se puede insertar un único gen extraño, se incluyen, aunque sin limitación: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el Virus del Sarcoma de Rous (RSV). Una serie de vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de tal forma que se puedan identificar y generar células transducidas. Se puede hacer que los vectores retrovíricos sean específicos para un objetivo uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. Se consigue el abordaje preferido usando un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden insertar secuencias polinucleotídicas específicas en el genoma retroviral o unir las a una envuelta vírica para permitir la administración específica de objetivo del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRIIa. En una realización preferida, el vector se dirige a hueso o cartílago.

Alternativamente, se pueden transfectar directamente las células de un cultivo tisular con plásmidos codificantes de los genes retrovíricos gag, pol y

env por transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células son entonces transfectadas con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovítico al medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigido para polinucleótidos ActRIIa es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Se pueden encapsular ARN, ADN y viriones intactos en el interior acuoso y administrarlos a células en una forma biológicamente activa (véase, v.g., Fraley, y col., Trends Biochem. Sci., 6: 77, 1981). Los métodos para una eficiente transferencia génica usando un vehículo liposómico son conocidos en la técnica; véase, v.g., Mannino, y col., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes.

Como ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas, se incluyen compuestos fosfatidílicos, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Como fosfolípidos ilustrativos, se incluyen la fosfatidilcolina de huevo, la dipalmitoilfosfatidilcolina y la diestearoilfosfatidilcolina. El envío dirigido de liposomas es también posible en base a, por ejemplo, la especificidad

de órganos, la especificidad de células y la especificidad de orgánulos, y es conocido en la técnica.

EJEMPLOS

5 Estando ahora descrita la invención en general, ésta será más fácilmente comprendida haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertas realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

10 Ejemplo 1: Proteínas de fusión ActRIIa-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIa soluble que tiene el dominio extracelular de la ActRIIa humana fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazante mínimo entre ellos. Se hace
15 referencia a las construcciones como ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc, respectivamente.

A continuación se muestra ActRIIa-hFc como purificada a partir de líneas de células CHO (SEC ID N°: 7):

20 ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPMEVETQPTSNPVTIPKPPTGG
GTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKA
KGOPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVL
25 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

Se expresaron las proteínas ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

- (i) Melitina de abejas melíferas (HBML):
30 MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEC ID N°: 8)
- (ii) Activador del plasminógeno de tejidos (TPA):
MDAMKRGLCCLVLLCGAVFVSP (SEC ID N°: 9)
- (iii) Nativa: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEC ID N°: 10).

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

DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEK
 FSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPC?APELLGGPSVFLFPKPKDITLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPVPKEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 5 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°:13)

Este polipéptido está codificado por la
 siguiente secuencia de ácido nucleico:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGT
 10 TTGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTTTTAATGC
 TAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAAACCGTCTTATGGTGACAAAG
 ATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAATAGTGA
 AACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAA
 AAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTT
 15 TTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGC
 CACCCACCGGTGTTGGAACTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACCTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGAC
 CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
 20 TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
 TGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
 25 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
 CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEC
 ID N°:14)

Tanto ActRIIa-hFc como ActRIIa-mFc podían ser
 30 notablemente llevadas a expresión recombinante. Como se
 muestra en la figura 1, se purificó la proteína como un
 solo pico, bien definido, de proteína. La secuenciación N-
 terminal reveló una sola secuencia de -ILGRSTQE (SEC ID N°:
 11). Se pudo conseguir la purificación por una serie de
 35 etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por
 ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden:

cromatografía con proteína A, cromatografía con sefarosa Q, cromatografía con fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio catiónico. Se pudo completar la purificación con filtración vírica e intercambio de tampón. Se purificó la proteína ActRIIa-hFc hasta una pureza >98%, según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaños, >95%, según se determinó por SDS PAGE.

ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc mostraron una alta afinidad por ligandos, particularmente por la activina A. Se inmovilizaron GDF-11 o Activina A ("ActA") sobre un chip Biacore CM5 usando un procedimiento de copulación de amina estándar. Se cargaron las proteínas ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc en el sistema y se midió la unión. ActRIIa-hFc se unió a activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{-12} y la proteína se unió a GDF11 con una K_D de $9,96 \times 10^{-9}$. Véase la figura 2. ActRIIa-mFc se comportó de forma similar.

Se usó un Ensayo de Genes Informadores A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIa-hFc sobre la señalización por GDF-11 y Activina A. Línea celular: Rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector informador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler y col., 1998, EMBO 17: 3091-3100). Véase la Figura 3. La unidad CAGA12 está presente en genes que responden a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para factores que señalizan a través de Smad2 y 3.

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

Día 2: Transfectar las células A-204 con 10 μ g de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12 (10 μ g)+pRLCMV (1 μ g) y Eugene.

Día 3: Añadir factores (diluidos en medio+0,1% de BSA). Los inhibidores necesitan ser preincubados con los Factores durante 1 h antes de añadirlos a las células. 6 h después, se aclaran las células con PBS y se lisan las células.

Esto va seguido de un ensayo de Luciferasa. Típicamente en este ensayo, en ausencia de cualquier inhibidor, la Activina A muestra aproximadamente una estimulación 10 veces mayor de la expresión del gen informador y una DE50 ~ 2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces mayor, DE50: ~ 1,5 ng/ml. GDF-8 muestra un efecto similar a GDF-11.

Como se muestra en la figura 4, ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc inhiben la señalización mediada por GDF-8 a concentraciones picomolares. Como se muestra en la figura 5, tres diferentes preparaciones de ActRIIa-hFc inhibían la señalización GDF-11 con una CI50 de aproximadamente 200 pM.

La ActRIIa-hFc era muy estable en los estudios farmacocinéticos. Se dosificaron ratas con 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActRIIa-hFc y se midieron los niveles plasmáticos de la proteína a 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio aparte, se dosificaron ratas a 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En ratas, ActRIIa-hFc tenía una vida media en suero de 11-14 días y los niveles circulantes del fármaco eran bastante altos después de dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente). En monos cinomolgos, la vida media plasmática era substancialmente mayor de 14 días y los niveles circulantes del fármaco eran de 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1.440 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente. Los resultados preliminares en humanos sugieren que la vida media en suero es de entre aproximadamente 20 y 30 días.

30 Ejemplo 2: ActRIIa-mFc promueve el crecimiento óseo in vivo

Se dosificaron ratones hembras normales (BALB/c) con ActRIIa-mFc a un nivel de 1 mg/kg/dosis, 3 mg/kg/dosis o 10 mg/kg/dosis, dando las dosis dos veces por semana. Se determinaron la densidad mineral del hueso y el contenido mineral del hueso por DEXA; véase la figura 6.

En ratones hembras BALB/c, los barridos DEXA

mostraron un aumento significativo (>20%) en la densidad y el contenido mineral del hueso como resultado del tratamiento con ActRIIa-mFc. Véanse las figuras 7 y 8.

5 Así, el antagonismo de ActRIIa provocó un aumento en la densidad y el contenido del hueso en ratones hembras normales. Como siguiente etapa, se estudió el efecto de ActRIIa-mFc sobre el hueso en un modelo murino para la osteoporosis.

10 Andersson y col. (2001), establecieron que los ratones ovariectomizados sufrían una pérdida ósea substancial (aproximadamente un 50% de pérdida de hueso trabecular seis meses después de la operación) y que la pérdida ósea en estos ratones podía ser corregida con agentes terapéuticos candidatos, tales como la hormona paratiroidea.

15 Los solicitantes usaron ratones hembras C57BL6 que habían sido ovariectomizadas (OVX) o sometidas a un simulacro de operación a las 4-5 semanas de edad. A las ocho semanas de la cirugía, se inició el tratamiento con ActRIIa-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) o control (PBS). Se midió la densidad ósea por barrido CT.

20 Como se muestra en la figura 9, los ratones ovariectomizados no tratados mostraron una pérdida substancial de densidad ósea trabecular en relación a los controles del simulacro después de seis semanas. El tratamiento con ActRIIa-mFc restauró la densidad ósea al nivel de los ratones sometidos al simulacro de operación. A las 6 y 12 semanas del tratamiento, ActRIIa-mFc produjo un aumento substancial en el hueso trabecular de los ratones

25 OVX. Véase la figura 10. Después de 6 semanas de tratamiento, la densidad ósea aumentó en un 24% en relación a los controles de PBS. Después de 12 semanas, el aumento era del 27%.

30 En los ratones sometidos al simulacro de operación, ActRIIa-mFc también causó un aumento substancial en el hueso trabecular. Véase la figura 11. Después de 6 y

12 semanas, el tratamiento produjo un aumento del 35% en relación a los controles.

En un grupo adicional de experimentos, se trataron ratones ovariectomizados (OVX) o sometidos a un simulacro de operación como se ha descrito anteriormente con ActRIIa-mFc (10 mg/kg, dos veces por semana) o control (PBS) a lo largo de doce semanas. De forma similar a los resultados antes descritos para ActRIIa-mFc, los ratones OVX que recibieron ActRIIa-mFc exhibían un aumento en la densidad ósea trabecular del 15% ya desde las cuatro semanas y del 25% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 12). Los ratones sometidos al simulacro de operación que recibieron ActRIIa-mFc mostraron de forma similar un aumento en la densidad ósea trabecular del 22% ya desde las cuatro semanas y del 32% después de 12 semanas de tratamiento (Figura 13).

Después de doce semanas de tratamiento con ActRIIa-mFc, el análisis DEXA del cuerpo entero y del fémur ex vivo mostró que el tratamiento induce un aumento en la densidad ósea tanto en ratones ovariectomizados como sometidos a un simulacro de operación (Figuras 14A y 14B, respectivamente). Estos resultados están también respaldados por el análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral, que demostró un aumento significativo en la densidad ósea tanto total como cortical después de doce semanas de tratamiento con ActRIIa-mFc. Los ratones ovariectomizados control tratados con vehículo exhibían densidades óseas comparables a los ratones control sometidos al simulacro de operación tratados con vehículo (Figura 15). Además de la densidad ósea, el contenido óseo aumentó después del tratamiento con ActRIIa-mFc. El análisis pQCT ex vivo el eje medio femoral demostró un aumento significativo en el contenido óseo tanto total como cortical después de doce semanas de tratamiento con ActRIIa-mFc, mientras que tanto los ratones ovariectomizados como los sometidos al simulacro de

operación tratados con control de vehículo exhibían un contenido óseo comparable (Figura 16). El análisis pQCT ex vivo del eje medio femoral también mostró que los ratones tratados con ActRIIa-mFc no exhibían ningún cambio en la

5 circunferencia perióstica, sin embargo, el tratamiento con ActRIIa-mFc dio lugar a una reducción en la circunferencia endóstica, lo que indica un aumento en el grosor cortical debido a crecimiento sobre la superficie interna del fémur (Figura 17).

10 Las pruebas mecánicas del fémur determinaron que ActRIIa-mFc era capaz de aumentar las características extrínsecas del hueso (carga máxima, rigidez y energía para romperlo) que contribuían a un aumento significativo en las propiedades intrínsecas (resistencia última) de los huesos.

15 Los ratones ovariectomizados tratados con ActRIIa-mFc exhibían una mayor resistencia ósea hasta niveles más allá de los de los controles tratados con vehículo y sometidos al simulacro de operación, lo que indica una completa reversión del fenotipo osteoporótico (Figura 18).

20 Estos datos demuestran que un antagonista activina-ActRIIa puede aumentar la densidad ósea en ratones hembras normales y, más aún, corregir los defectos en la densidad ósea, el contenido óseo y finalmente la resistencia ósea, en un modelo murino de osteoporosis.

25 En otro grupo de experimentos, los ratones fueron ovariectomizados o sometidos a un simulacro de operación a las 4 semanas y, comenzando a las 12 semanas, recibieron placebo o ActRIIa-mFc (2 veces/semana, 10 mg/kg) (a la que también se hace referencia como RAP-11 en las

30 Figuras 19-24), durante otro período de 12 semanas. Se evaluaron una variedad de parámetros óseos. Como se muestra en la Figura 19, ActRIIa-mFc aumentó el volumen óseo trabecular vertebral hasta razones de volumen total (BV/TV) tanto en los ratones OVX como en los sometidos a SHAM.

35 ActRIIa-mFc también mejoró la arquitectura trabecular (Figura 20), aumentó el grosor cortical (Figura 21) y

mejoró la resistencia ósea (Figura 22). Como muestra la Figura 23, ActRIIa-mFc produjo efectos deseables en un rango de dosis de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

Se realizó la histomorfometría ósea en un punto temporal de 2 semanas en los ratones sometidos al simulacro de operación. Estos datos, presentados en la Figura 24, demuestran que ActRIIa-mFc tiene un efecto doble, inhibiendo la resorción ósea a la vez que promueve el crecimiento óseo. Por lo tanto, ActRIIa-mFc estimula el crecimiento óseo (efecto anabólico) e inhibe la resorción ósea (efecto anticatabólico).

Ejemplo 4: Proteínas ActRIIa-Fc alternativas

Una construcción alternativa puede tener una delección de la cola C-terminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRIIa). La secuencia para dicha construcción es presentada a continuación (porción Fc subrayada) (SEC ID N°: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPVPLEKTISKAKGQPREPOVYTLPPS
REEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQFENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVD
KSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTOKSLSLSPGK

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes aquí mencionadas son aquí incorporadas a modo de referencia en su totalidad como si cada publicación o patente individual estuviese específica e individualmente indicada como incorporada a modo de referencia.

Aunque se han discutido realizaciones específicas de la materia objeto, la descripción anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán aparentes para los expertos en la técnica tras revisar esta descripción y las reivindicaciones que se dan a continuación. El alcance total de la invención será determinado haciendo referencia a las reivindicaciones,

REIVINDICACIONES:

1. Un polipéptido ActRIIa que se une a activina que tiene una secuencia de aminoácidos consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7.
- 5 2. El polipéptido ActRIIa que se une a activina de la reivindicación 1, donde el polipéptido es al menos un 95% puro con respecto a contaminantes proteicos, según se determina por cromatografía de exclusión por tamaños.
- 10 3. El polipéptido ActRIIa que se une a activina de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el polipéptido exhibe una selectividad al menos 10 veces mayor en la constante de disociación para la activina frente a GDF-11.
- 15 4. Una preparación farmacéutica consistente en el polipéptido ActRIIa que se une a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. La preparación farmacéutica de la reivindicación 4, donde dicha preparación está substancialmente libre de pirógenos.
- 25 6. Un polinucleótido aislado que incluye una secuencia codificante para el polipéptido ActRIIa que se une a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
7. El polinucleótido aislado de la reivindicación 6, donde el polinucleótido aislado comprende una secuencia de la SEC ID N°: 14.
- 30 8. Un polinucleótido recombinante que incluye una secuencia promotora operativamente unida a un polinucleótido de las reivindicaciones 6 ó 7.
9. Una célula transformada con un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
- 35 10. La célula de la reivindicación 9, donde la célula es una célula de mamífero.
11. La célula de la reivindicación 10, donde la célula es una célula CHO o una célula humana.
12. Un método de preparación de un polipéptido

ActRIIa que se une a activina, consistente en: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido ActRIIa soluble, donde dicha célula es transformada con un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, y b) recuperar el polipéptido ActRIIa que se une a activina así expresado.

13. Un método para promover el crecimiento óseo, aumentar la densidad ósea o aumentar la resistencia ósea, cuyo método consiste en administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido seleccionado entre el grupo consistente en: a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a la SEC ID N°:2; b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a la SEC ID N°:3, y c) un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados entre la SEC ID N°:2.

14. El método de la reivindicación 13, donde el polipéptido tiene una o más de las siguientes características: i) se une a un ligando ActRIIa con una K_D de al menos 10^{-7} M y ii) inhibe la señalización de ActRIIa en una célula.

15. El método de las reivindicaciones 13 ó 14, donde dicho polipéptido es una proteína de fusión que incluye, además de un dominio de polipéptido ActRIIa, una o más porciones polipeptídicas que aumentan una o más de estabilidad *in vivo*, vida media *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.

16. El método de la reivindicación 15, donde dicha proteína de fusión incluye una porción polipeptídica seleccionada entre el grupo consistente en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una seroalbúmina.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde dicho polipéptido incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado,

un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.

5 18. Un método para tratar un trastorno relacionado con el hueso, cuyo método consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un antagonista de activina o ActRIIa.

10 19. El método de la reivindicación 18, donde el antagonista de activina o ActRIIa es un polipéptido antagonista de activina o ActRIIa.

15 20. El método de la reivindicación 19, donde el polipéptido antagonista de activina o ActRIIa es seleccionado entre el grupo consistente en: a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 2; b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 3, y c) un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados entre la SEC ID
20 N°: 2.

21. El método de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el polipéptido antagonista de activina o ActRIIa tiene una o más de las siguientes características: i) se une a un ligando ActRIIa con una K_D de al menos 10^{-7} M y ii)
25 inhibe la señalización de ActRIIa en una célula.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, donde dicho polipéptido antagonista de activina o ActRIIa es una proteína de fusión que incluye, además de un dominio polipeptídico ActRIIa, una o
30 más porciones polipeptídicas que aumentan una o más de estabilidad *in vivo*, vida media *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.

23. El método de la reivindicación 22, donde
35 dicha proteína de fusión incluye una porción polipeptídica seleccionada entre el grupo consistente en: un dominio Fc

de inmunoglobulina y una seroalbúmina.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-23, donde dicho polipéptido antagonista de activina o ActRIIa incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-24, donde el trastorno relacionado con el hueso es seleccionado entre el grupo consistente en: osteoporosis primaria y osteoporosis secundaria.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-24, donde el trastorno relacionado con el hueso es seleccionado entre el grupo consistente en: osteoporosis posmenopáusica, pérdida ósea hipogonadal, pérdida ósea inducida por tumores, pérdida ósea inducida por la terapia contra el cáncer, metástasis óseas, mieloma múltiple y enfermedad de Paget.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-26, donde el método consiste además en administrar un segundo agente activo para el hueso.

28. El método de la reivindicación 27, donde el agente activo para el hueso es seleccionado entre el grupo consistente en: un bisfosfonato, un estrógeno, un modulador de los receptores de estrógenos selectivo, una hormona paratiroidea, una calcitonina, un suplemento de calcio y un suplemento de vitamina D.

29. Una preparación farmacéutica consistente en: (a) un antagonista de activina o ActRIIa y (b) un segundo agente activo para el hueso.

30. Un método de identificación de un agente que promueve el crecimiento óseo o que aumenta la densidad ósea, cuyo método consiste en: a) identificar un agente de ensayo que se une a un dominio de unión a ligando de un

polipéptido ActRIIa competitivamente con un polipéptido antagonista de activina o ActRIIa y b) evaluar el efecto del agente sobre el crecimiento del tejido.

5 31. Uso de un polipéptido antagonista de activina o ActRIIa para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con el hueso.

32. Un método para prevenir un trastorno relacionado con el hueso, cuyo método consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un antagonista de activina o ActRIIa.

10 33. El método de la reivindicación 32, donde el sujeto tiene un cáncer asociado a metástasis óseas.

34. El método de las reivindicaciones 32-33, donde el sujeto es positivo para un indicador de pérdida de densidad ósea, resorción ósea o metástasis óseas.

15 35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-34, donde el sujeto es el receptor de un régimen de tratamiento para el cáncer que se asocia a pérdida ósea.

20 36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-34, donde el sujeto tiene un cáncer asociado a pérdida ósea.

37. El polipéptido ActRIIa que se une a activina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, la preparación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4-5 ó 29 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 13-28, donde el polipéptido está glicosilado.

25 38. Un método para promover el crecimiento del hueso e inhibir la resorción ósea en un paciente, cuyo método consiste en administrar al paciente una cantidad efectiva de una proteína de fusión ActRIIa-Fc, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3.

35 39. El método de la reivindicación 38, donde la

proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3.

40. El método de las reivindicaciones 38 ó 39,
5 donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-40, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
10 N°:2.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-41, donde el método provoca menos de un 10% de aumento en la masa muscular esquelética del paciente.

43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-41, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc es administrada para alcanzar una concentración sérica en el paciente de al menos 0,2 µg/kg.
15

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-43, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7.
20

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-44, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc tiene una vida media en suero de entre 15 y 30 días.
25

46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-45, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc es administrada al paciente no más frecuentemente de una vez por semana.
30

47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-46, donde la proteína de fusión ActRIIa-Fc es administrada al paciente no más frecuentemente de una vez al mes.
35

48. Uso de un polipéptido seleccionado entre el grupo consistente en: (a) un polipéptido consistente en una

secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 2; (b) un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 3; y (c) un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados entre la SEC ID N°: 2, para la preparación de un medicamento para promover el crecimiento óseo, aumentar la densidad ósea o aumentar la resistencia ósea.

49. Uso de un polipéptido antagonista de activina o ActRIIa para la preparación de un medicamento para prevenir un trastorno relacionado con el hueso.

50. Uso de una proteína de fusión ActRIIa-Fc que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 para la preparación de un medicamento para promover el crecimiento óseo e inhibir la resorción ósea.

51. Un polipéptido seleccionado entre el grupo consistente en: (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 2; (b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 3; y (c) un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados entre la SEC ID N°: 2, para uso en la promoción del crecimiento óseo, el aumento de la densidad ósea o el aumento de la resistencia ósea.

52. Un polipéptido antagonista de activina o ActRIIa para uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con el hueso.

53. Un polipéptido antagonista de activina o ActRIIa para uso en la prevención de un trastorno relacionado con el hueso.

54. Una proteína de fusión ActRIIa-Fc que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 para uso en la promoción del crecimiento óseo y la inhibición de la resorción ósea.

**ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRIIA Y USOS
PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO ÓSEO**

5

RESUMEN

En cierto aspecto, la presente invención muestra composiciones y métodos para provocar el crecimiento oseó e incrementar la densidad oseá.

1

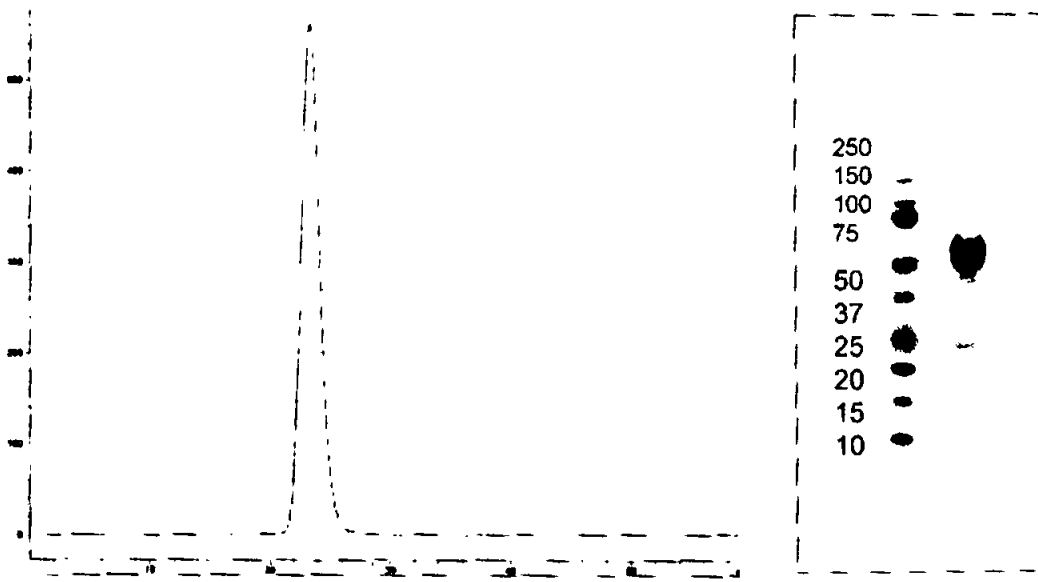


Figura 1



Figure 1

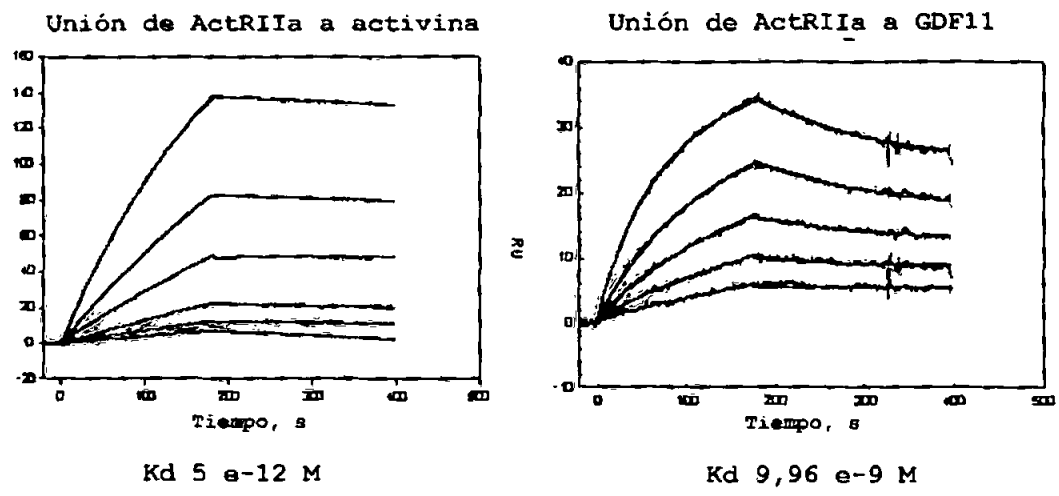


Figura 2

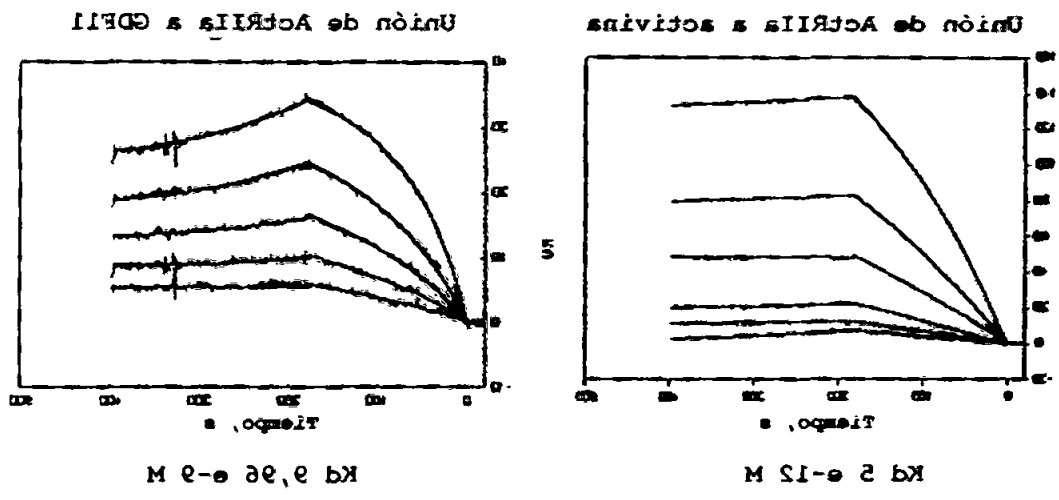


Figura 2

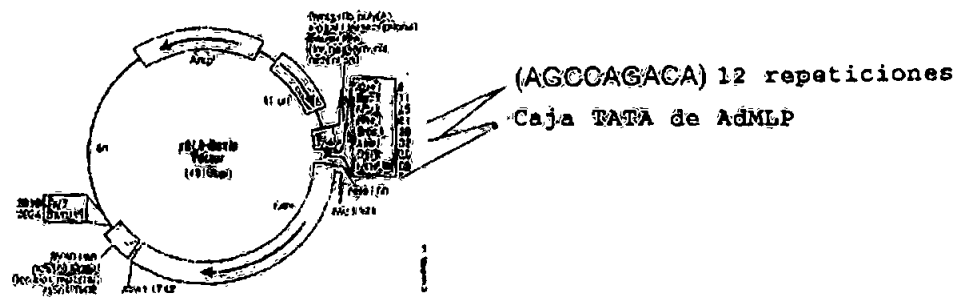


Figura 3

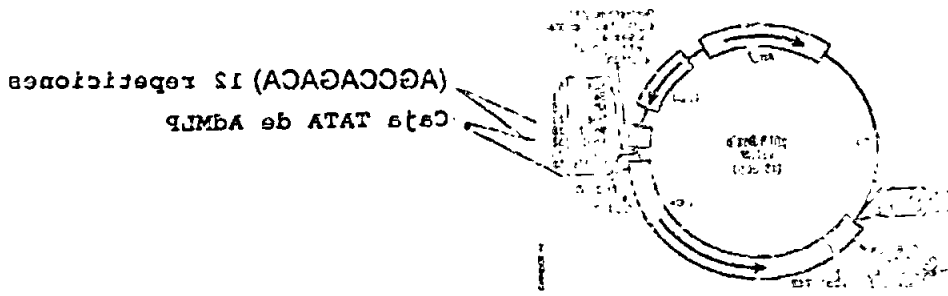


Figura 3

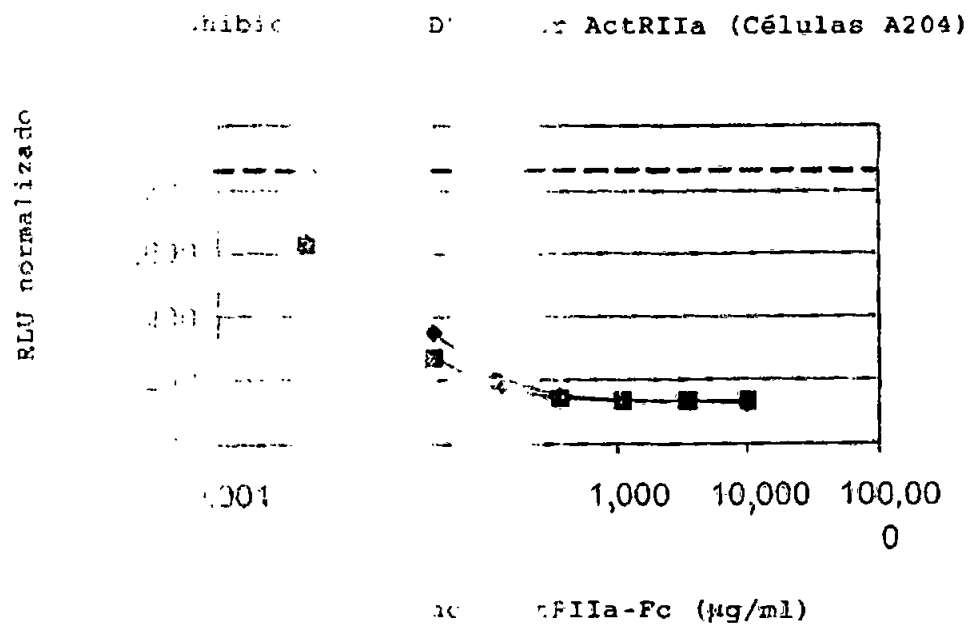


Figura 4

D. *Accutria* (Ceftriaxone A204)

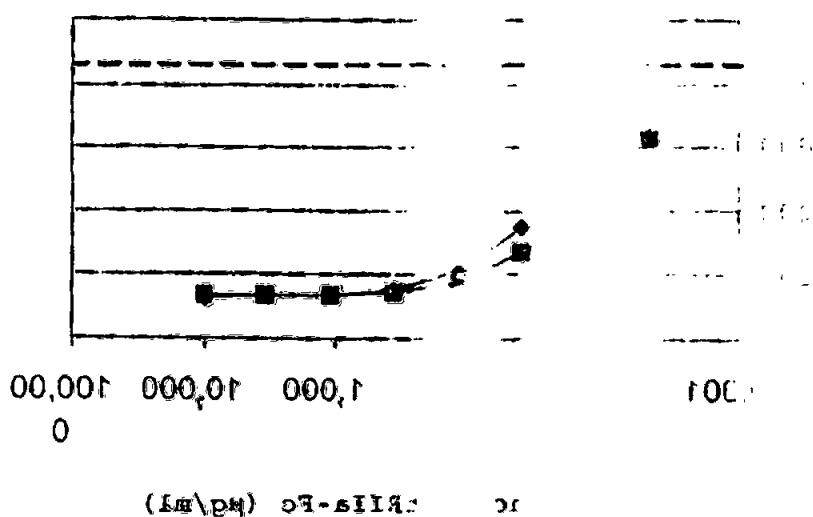


Figure 4

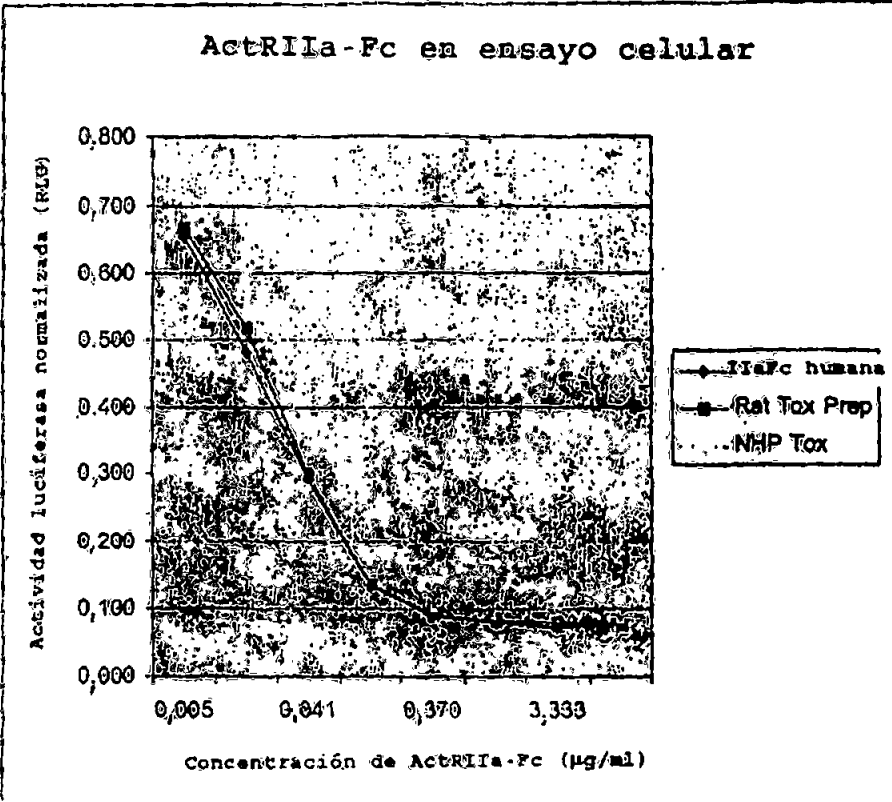


Figura 5

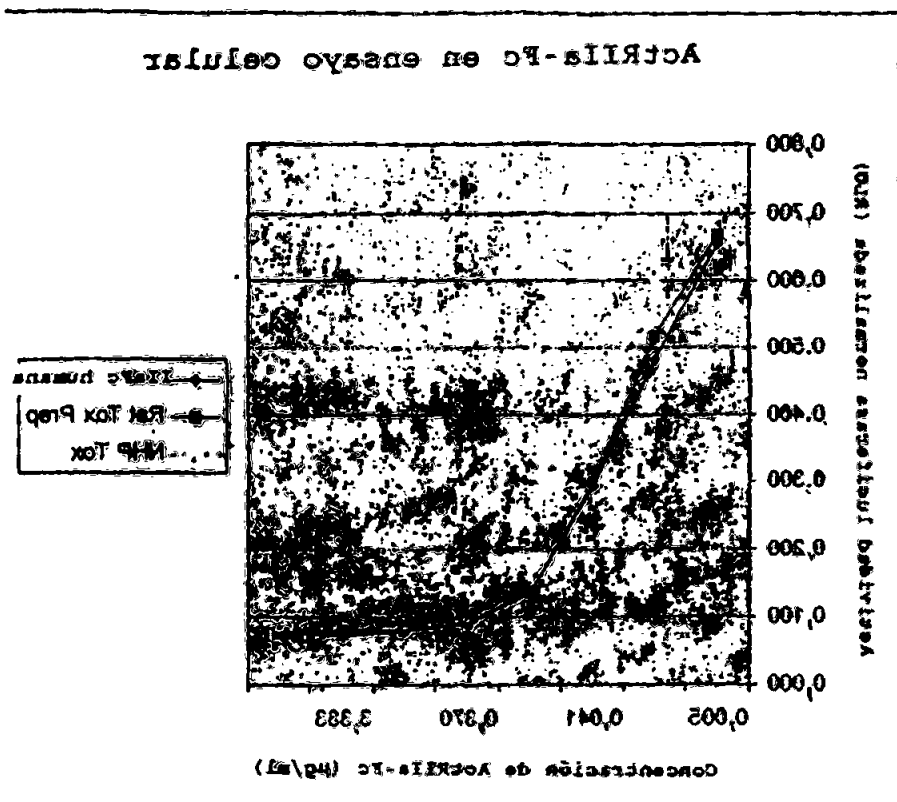


Figura 2

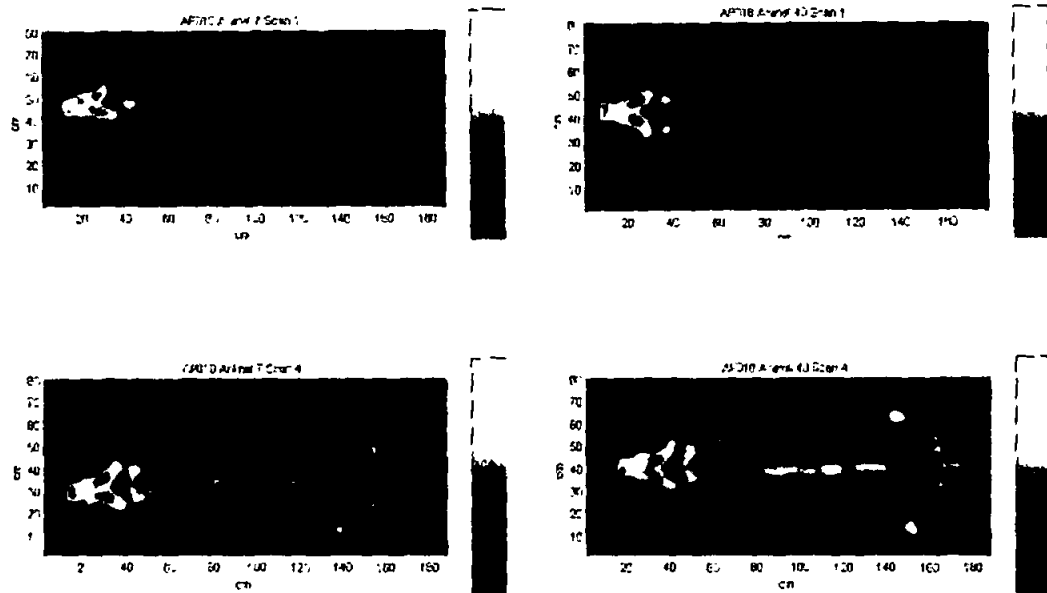


Figura 6

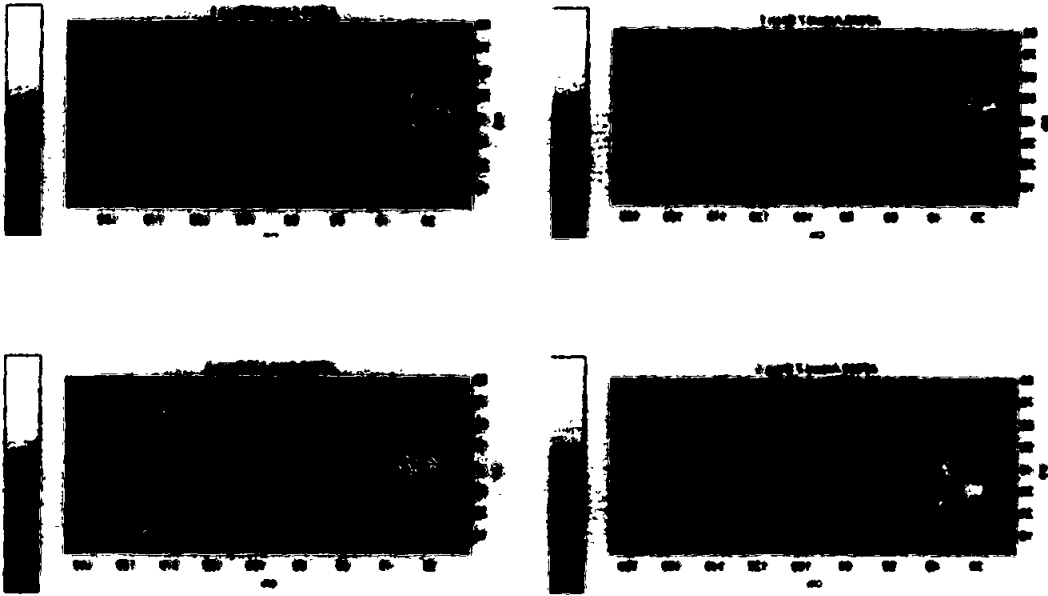


Figura 6

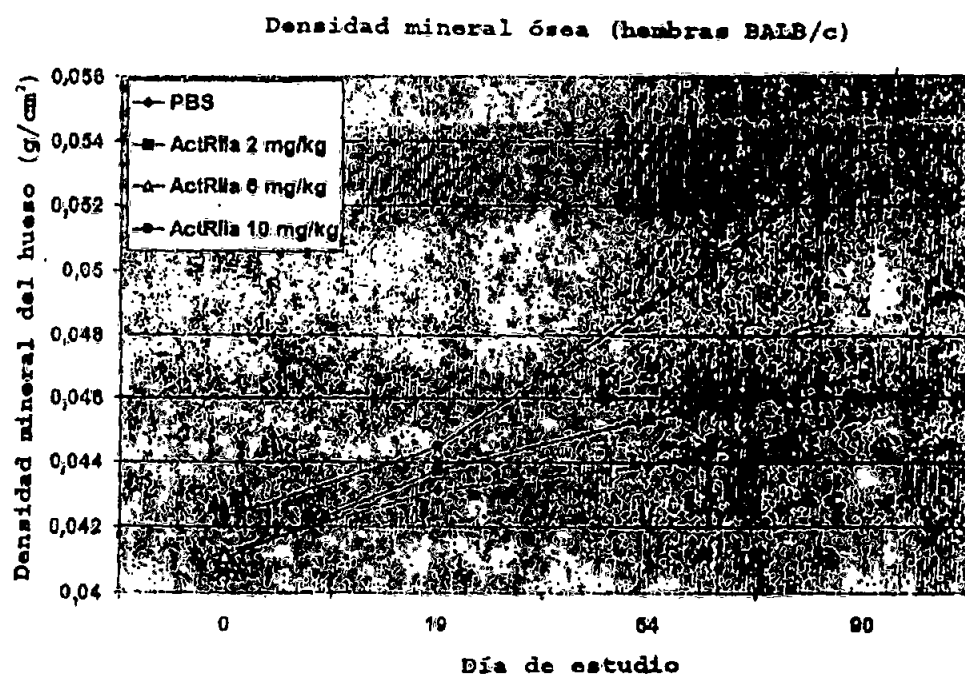


Figura 7

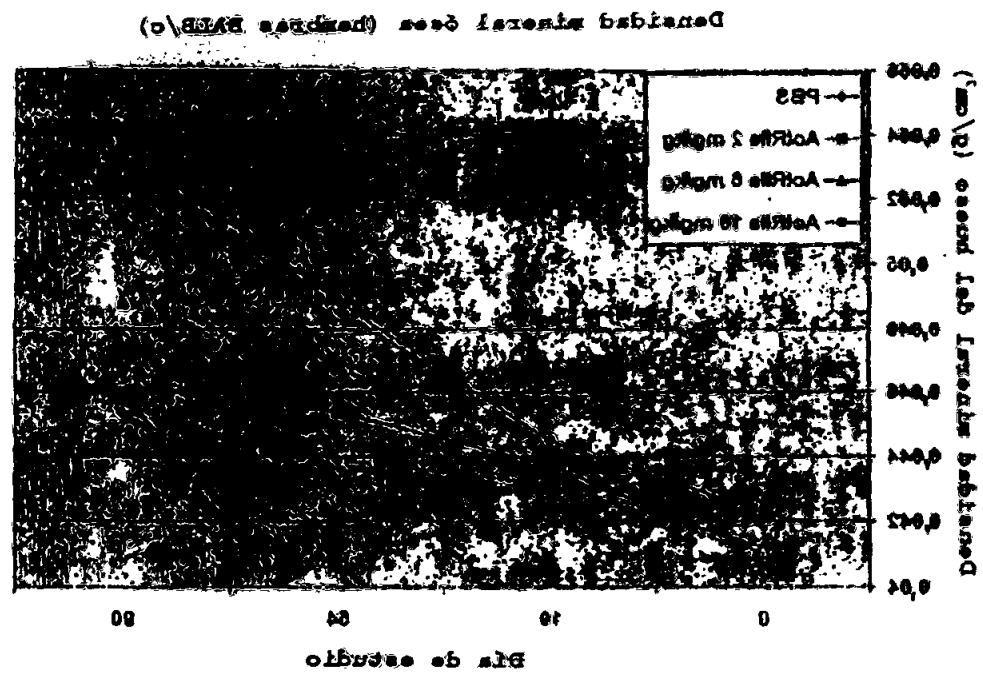


Figure 7

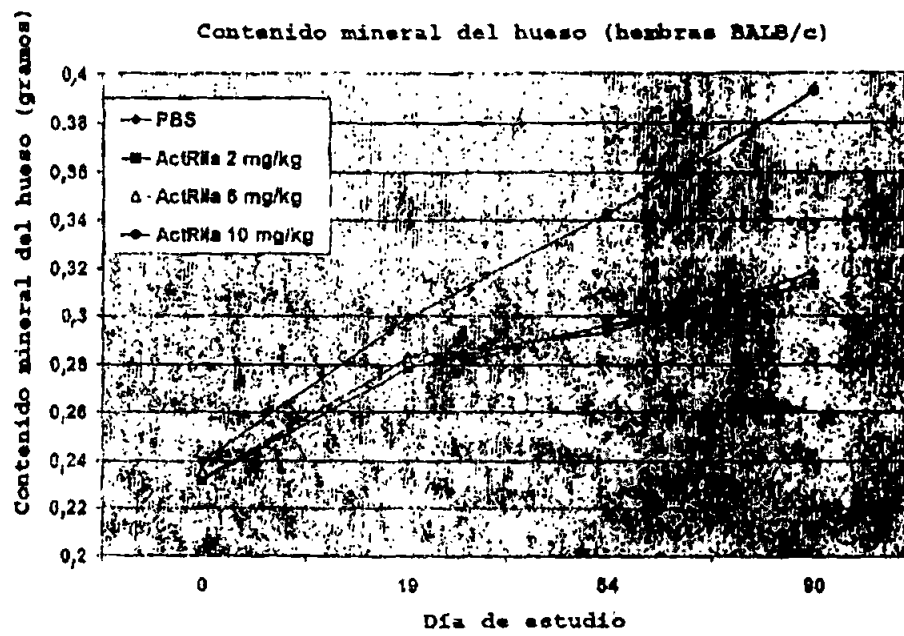


Figura 8

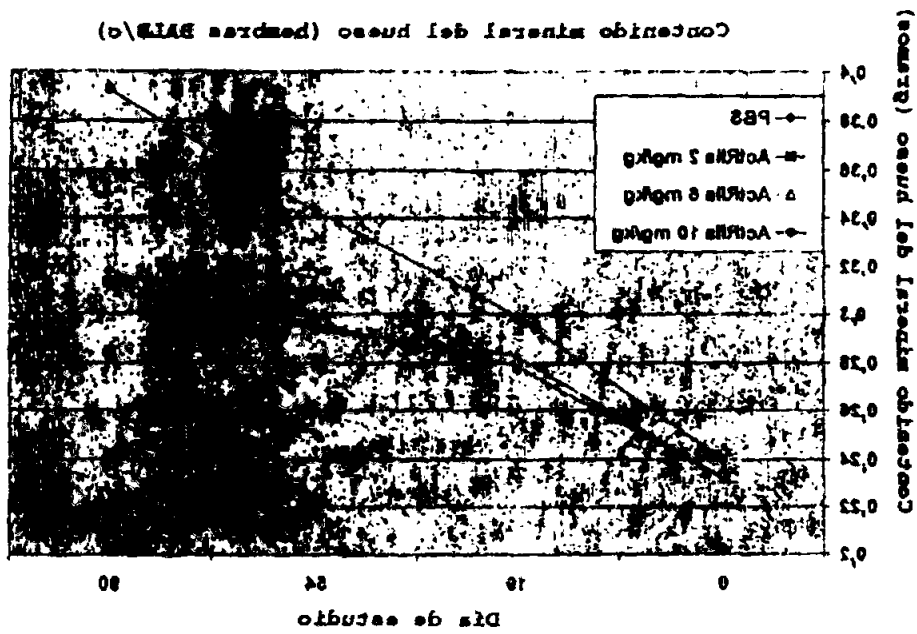


Figura 8

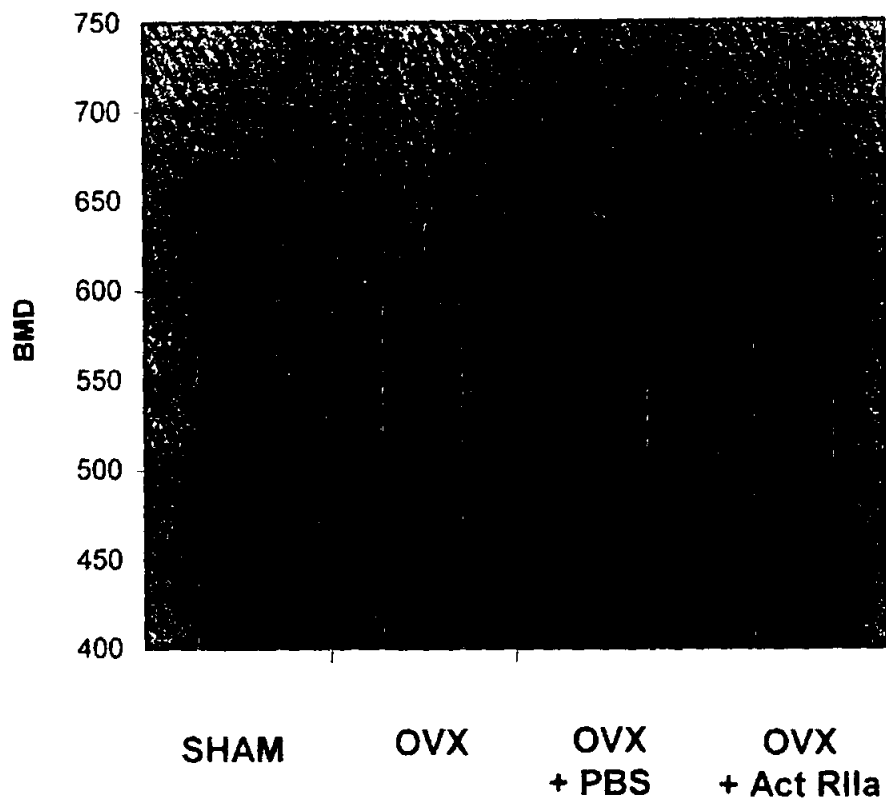


Figura 9

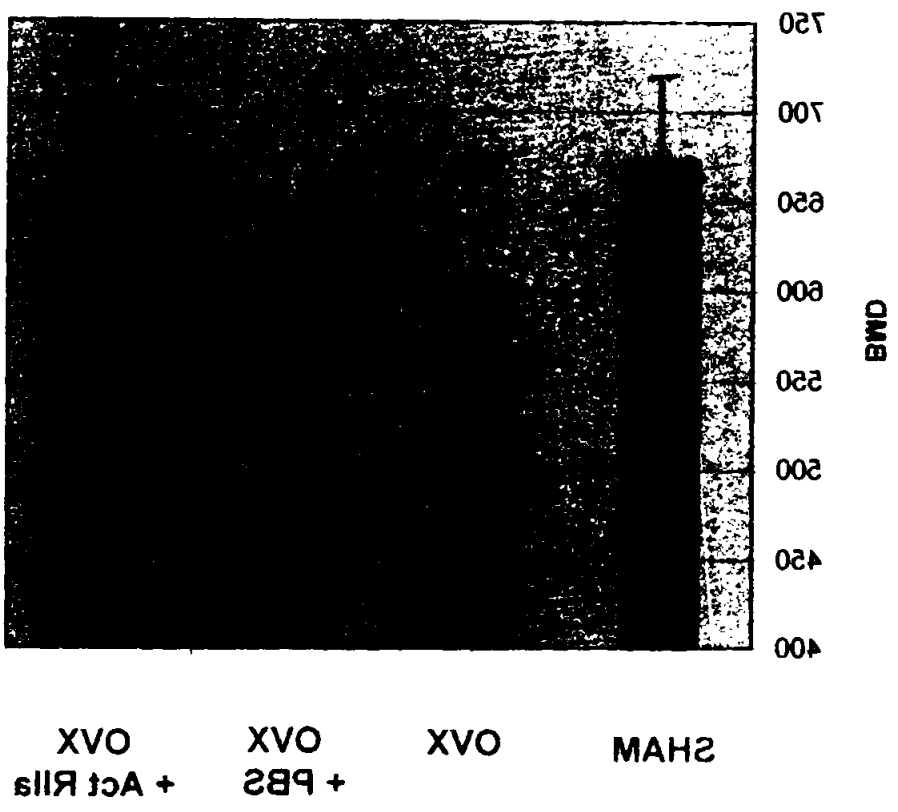


Figure 2

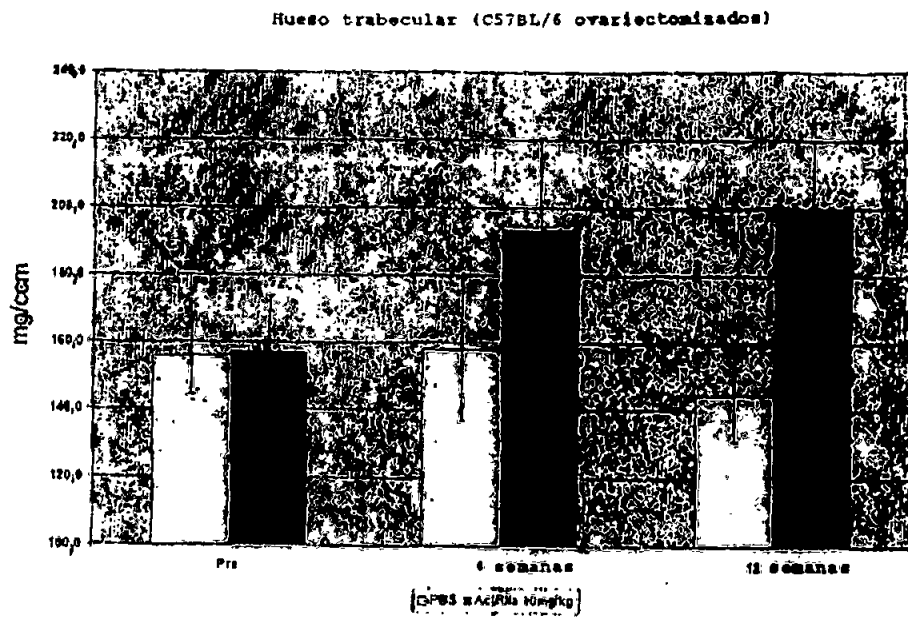


Figura 10

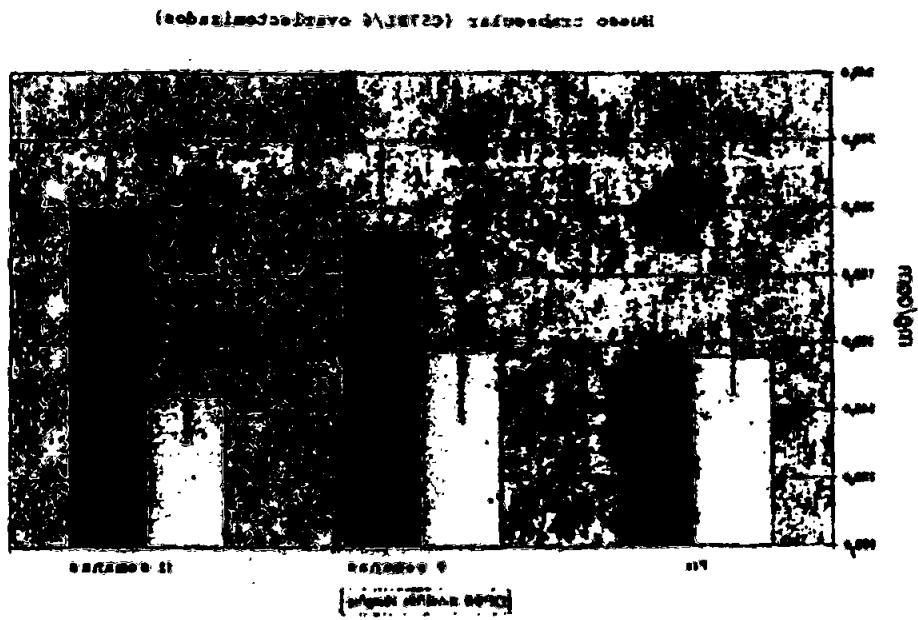


Figure 10

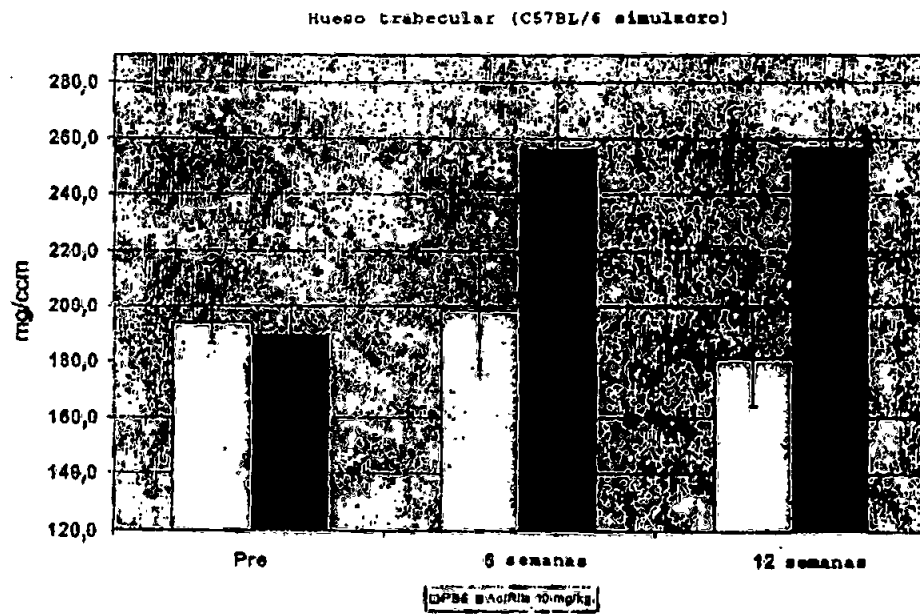


Figura 11

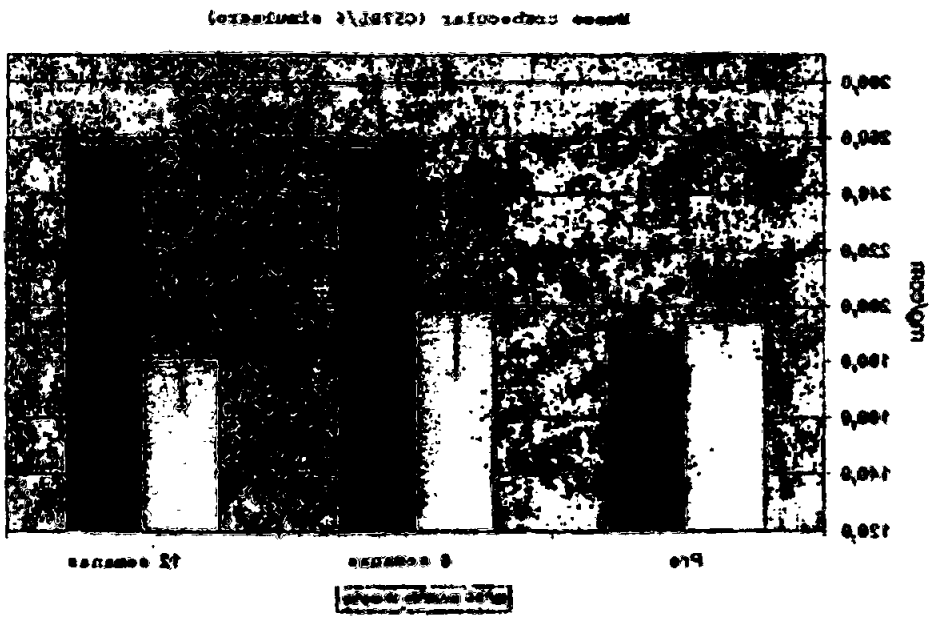


Figure 11

Densidad ósea trabecular metafisaria (ratones C57BL/6 ovariectomizados) ¹⁹⁹⁰
¹⁹⁹¹

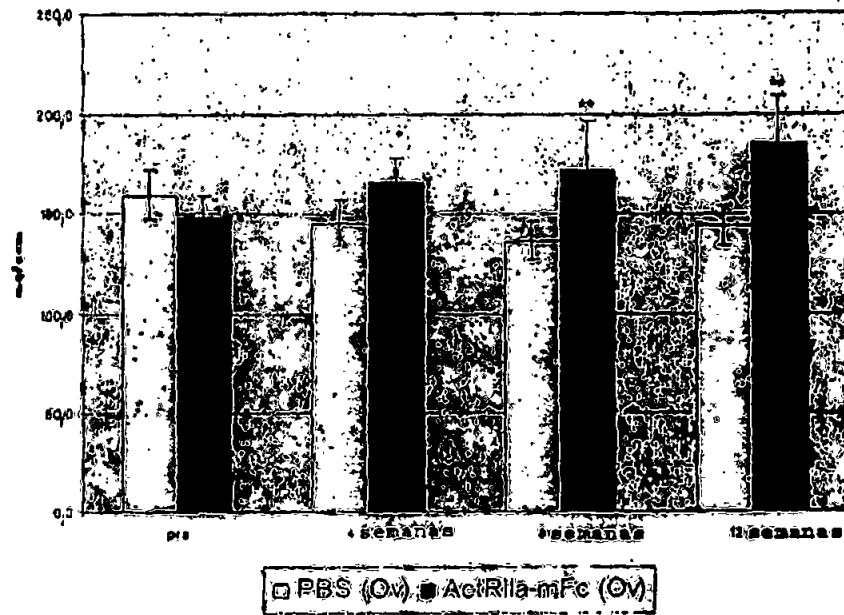
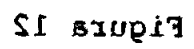
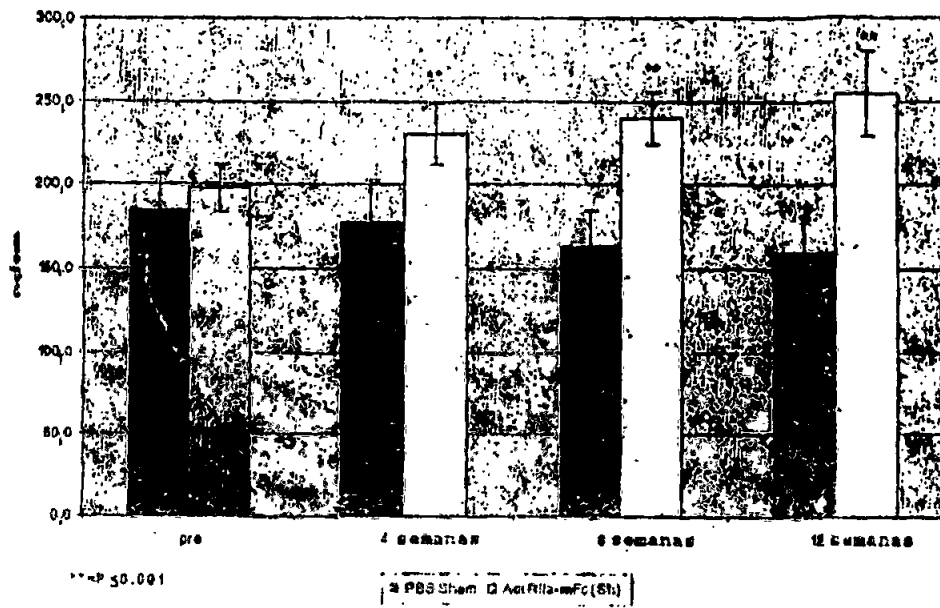


Figura 12



Densidad ósea trabecular metafisaria (ratones C57BL/6 con simulacro de operación)



Figura

Denotados de las respuestas metacognitivas (respuestas C27B1\6 con énfasis de operación)

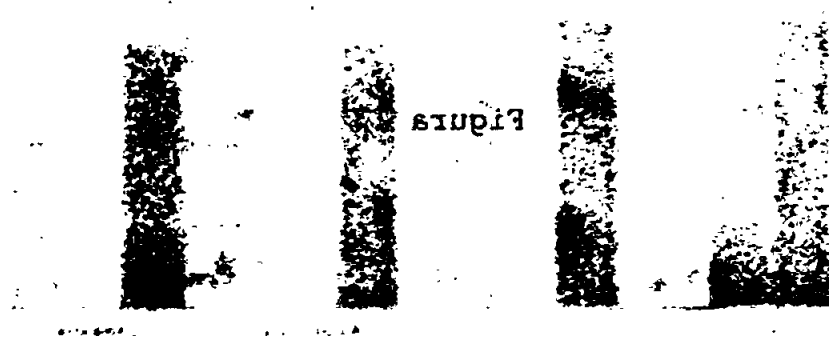
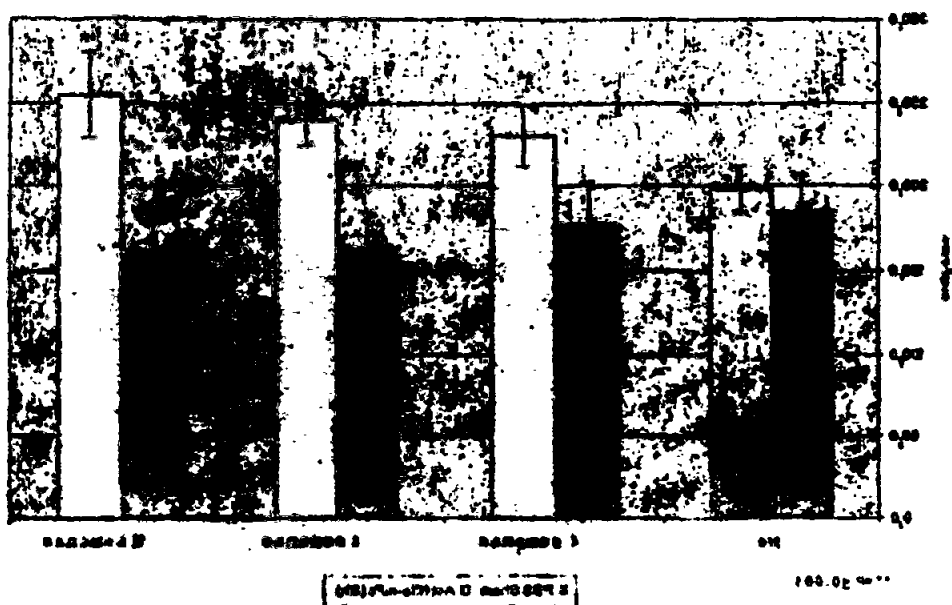


Figura 30

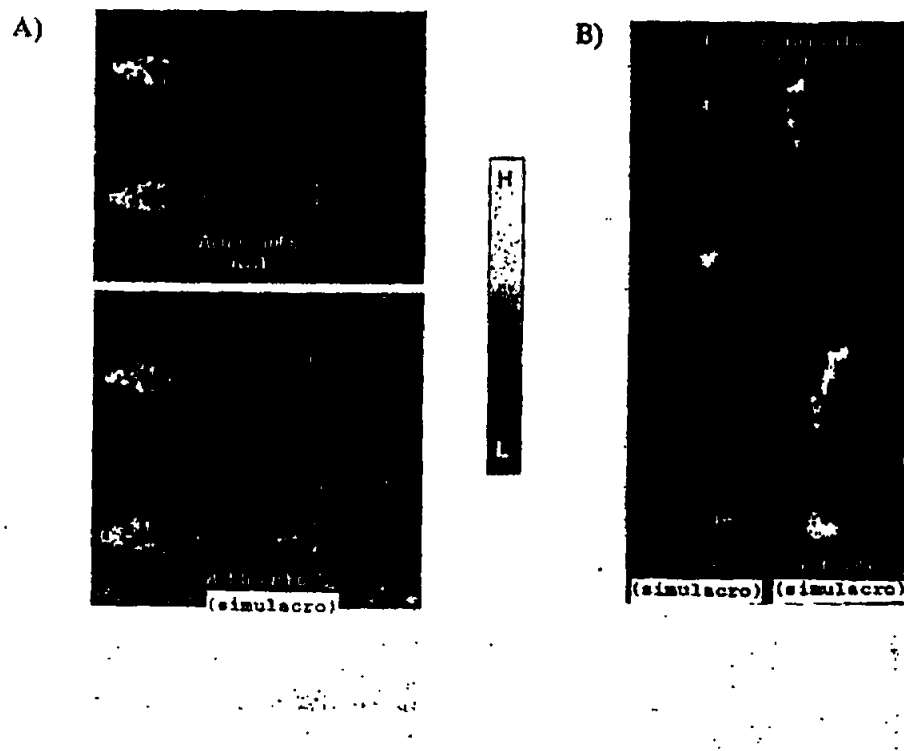


Figura 14

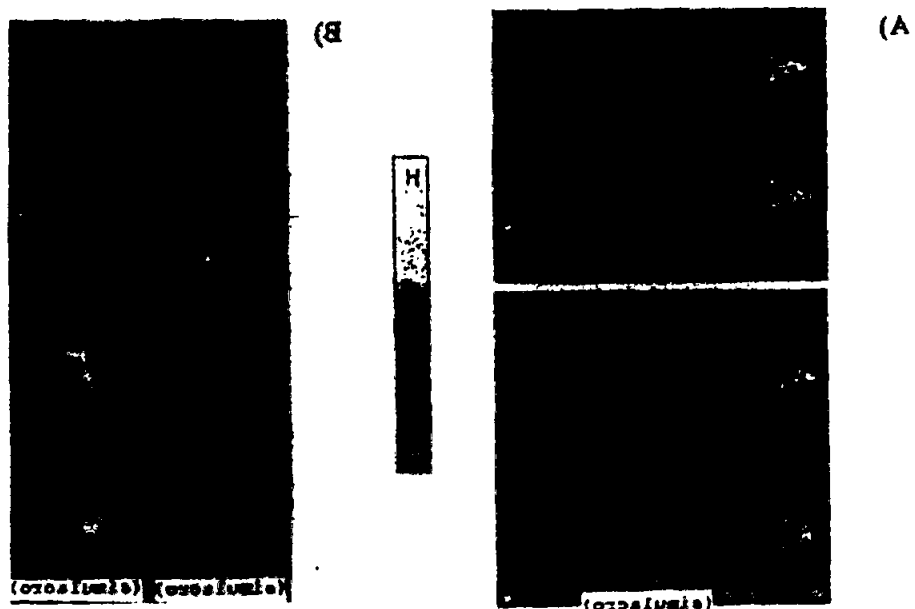


Figure 14

Densidad ósea ex vivo de fémures

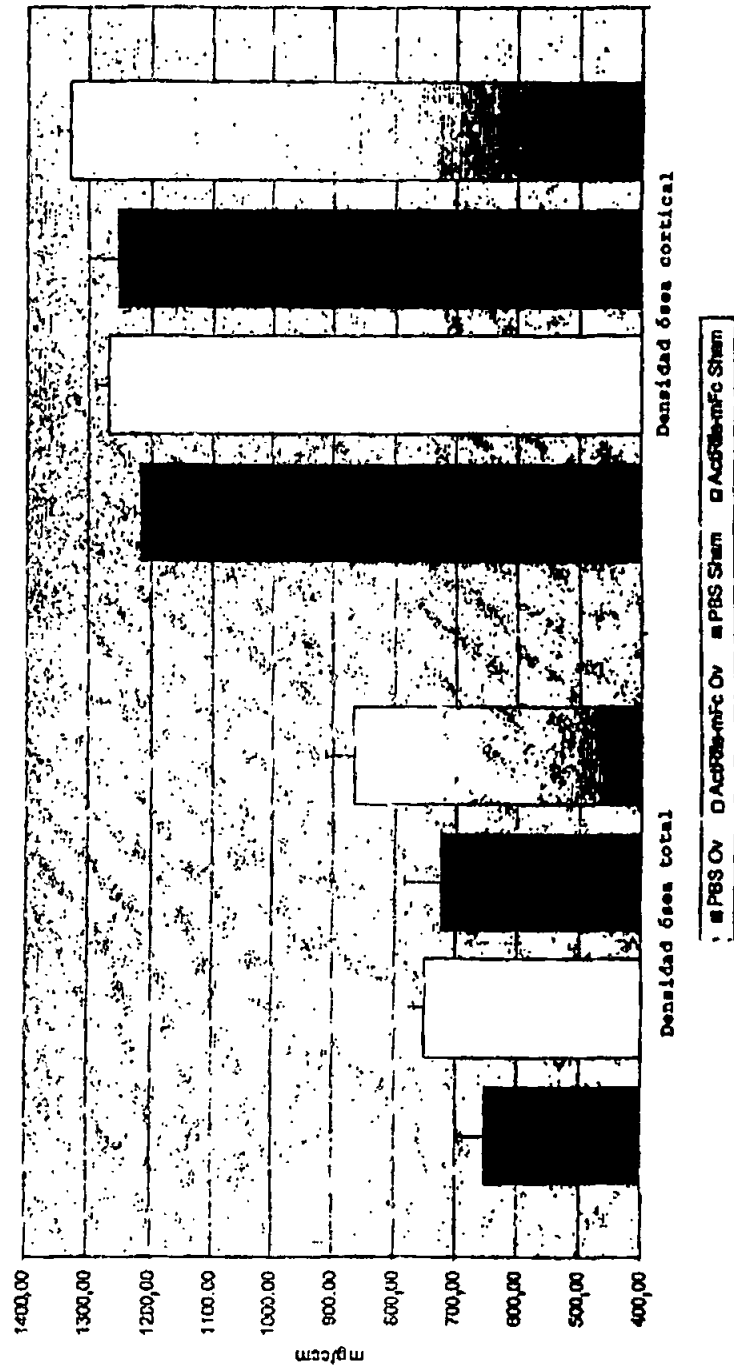
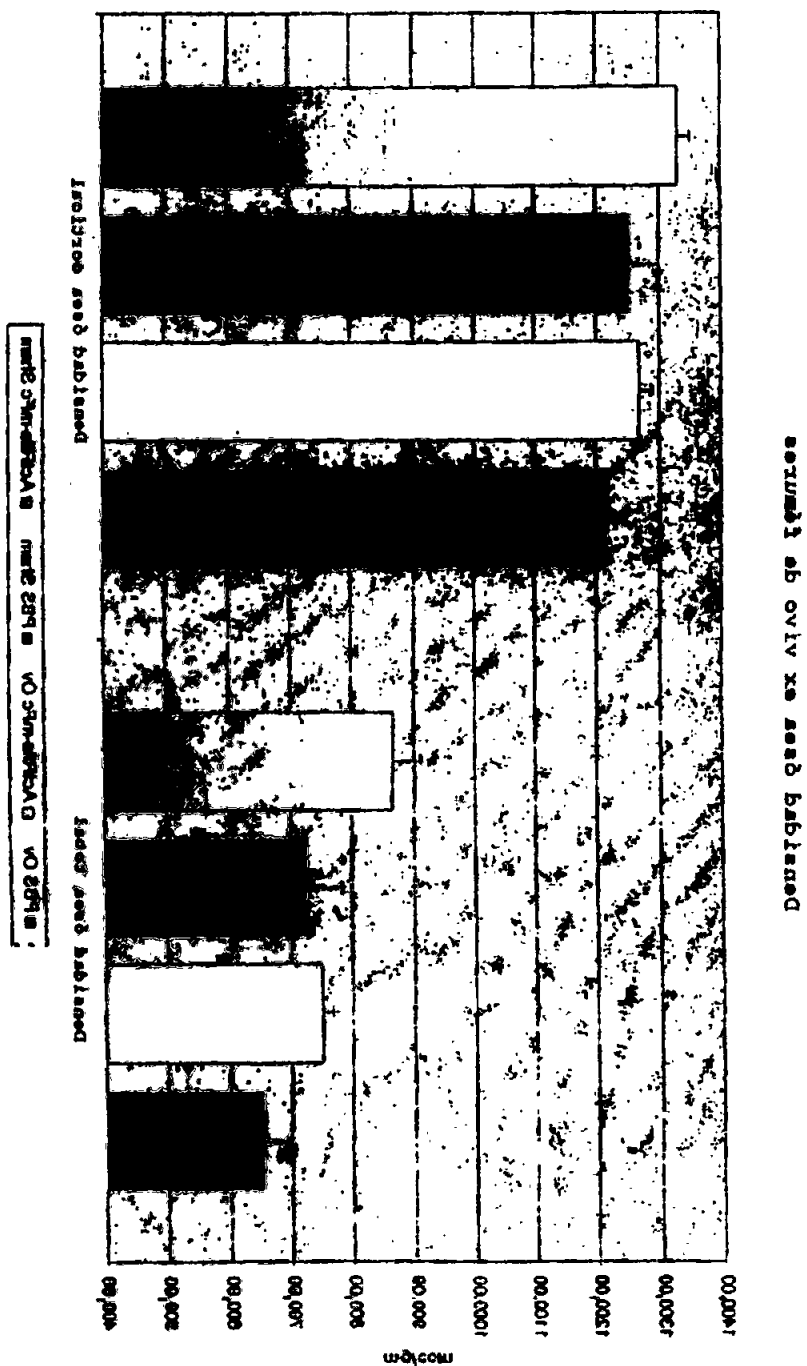


Figura 15



Figures 12

Grosor cortical femoral ex vivo

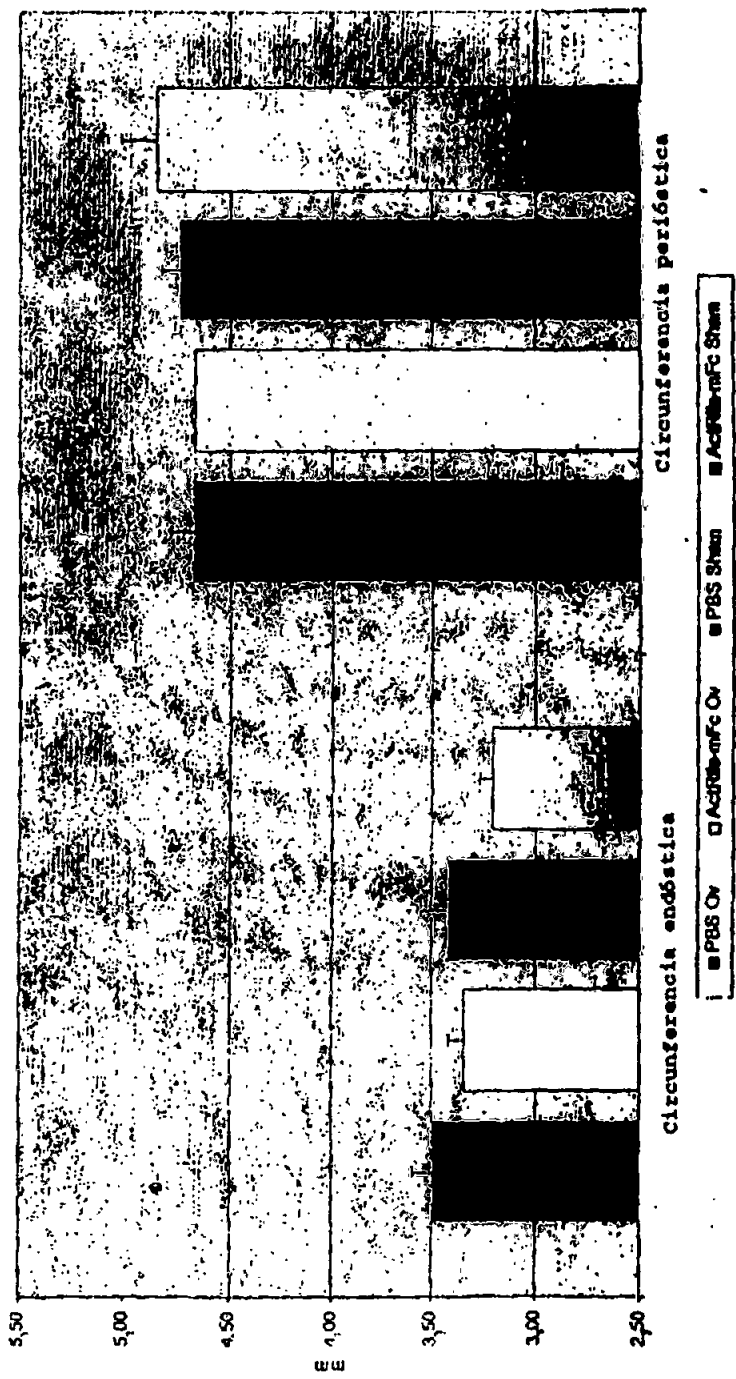


Figura 17

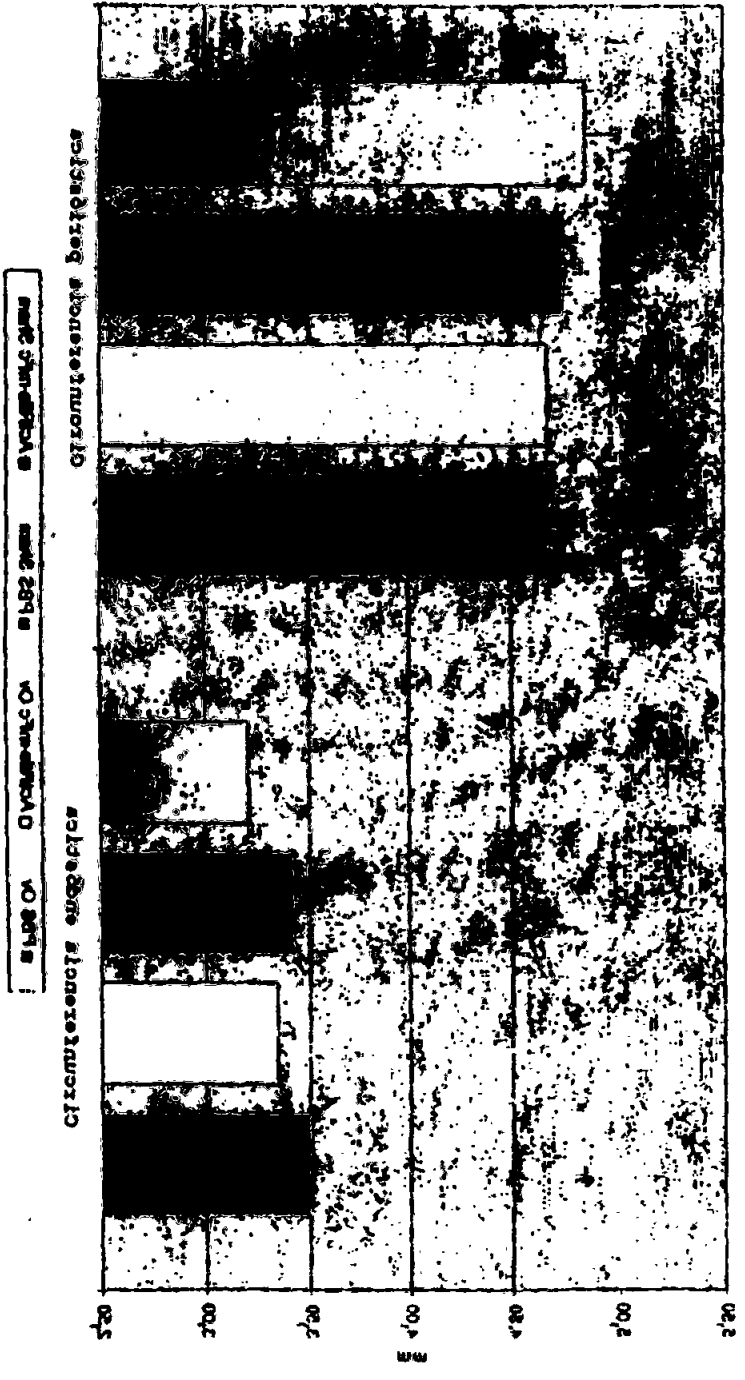


Figure 13

Contenido óseo diafisario de fémures

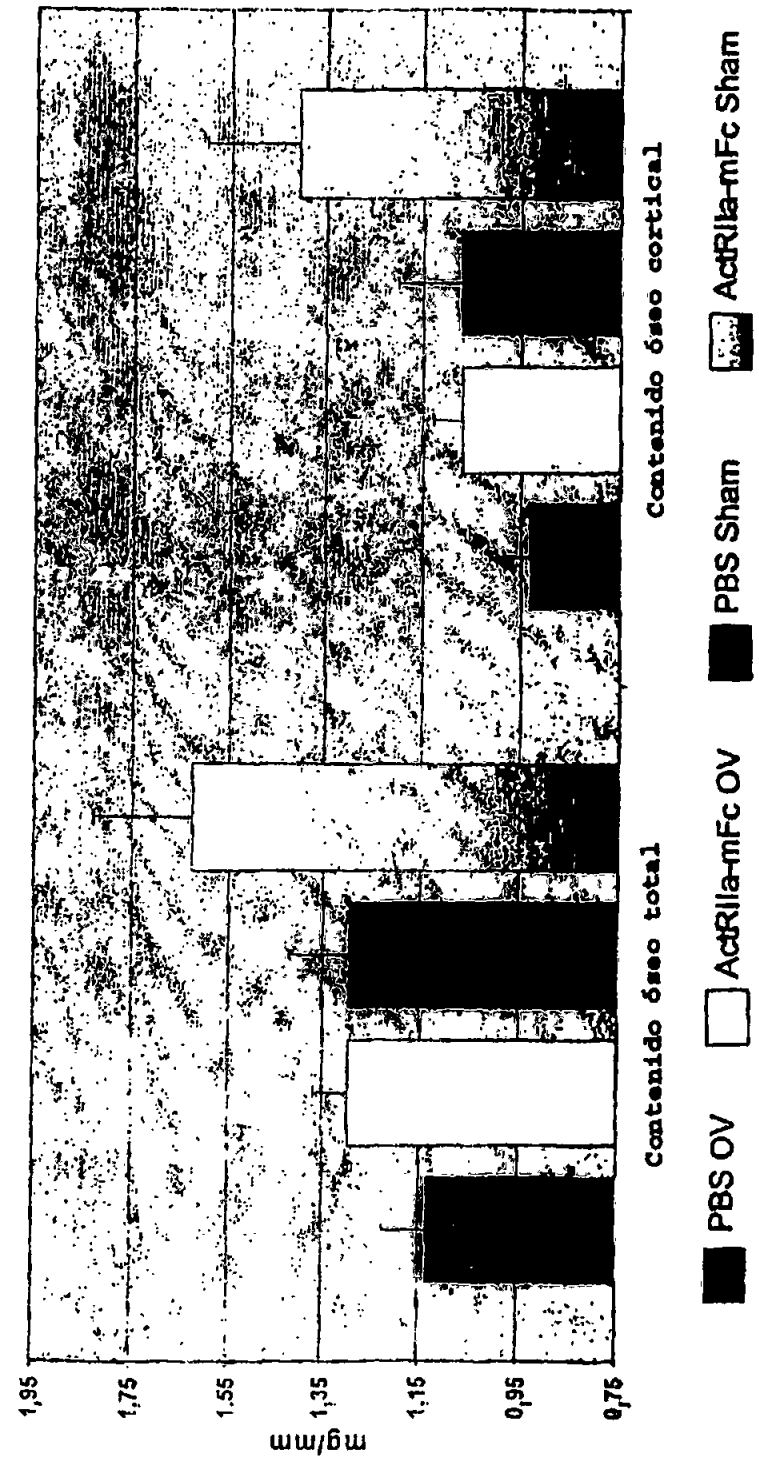
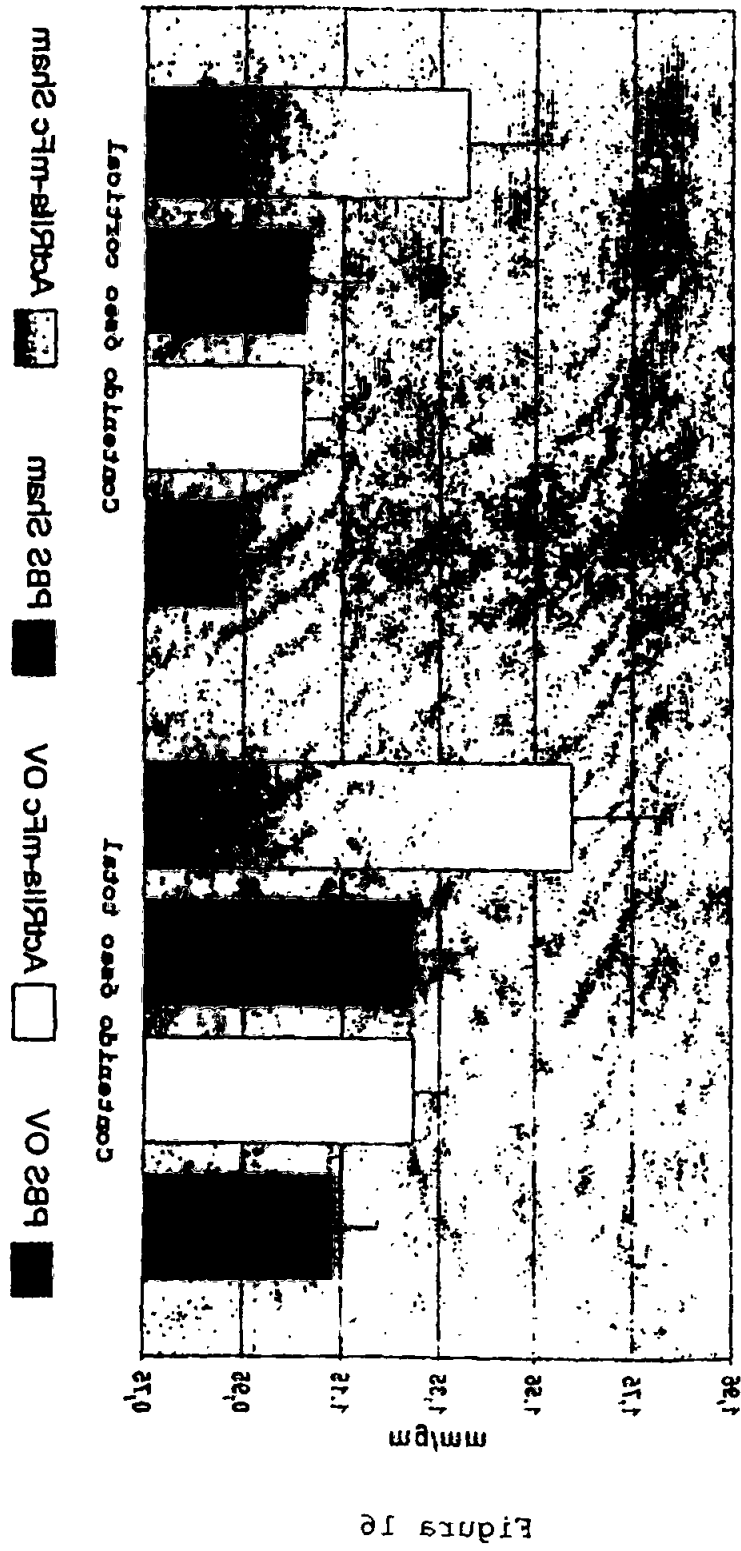


Figura 16

Contenido base de térmica



Pruebas biomecánicas de cuatro puntos

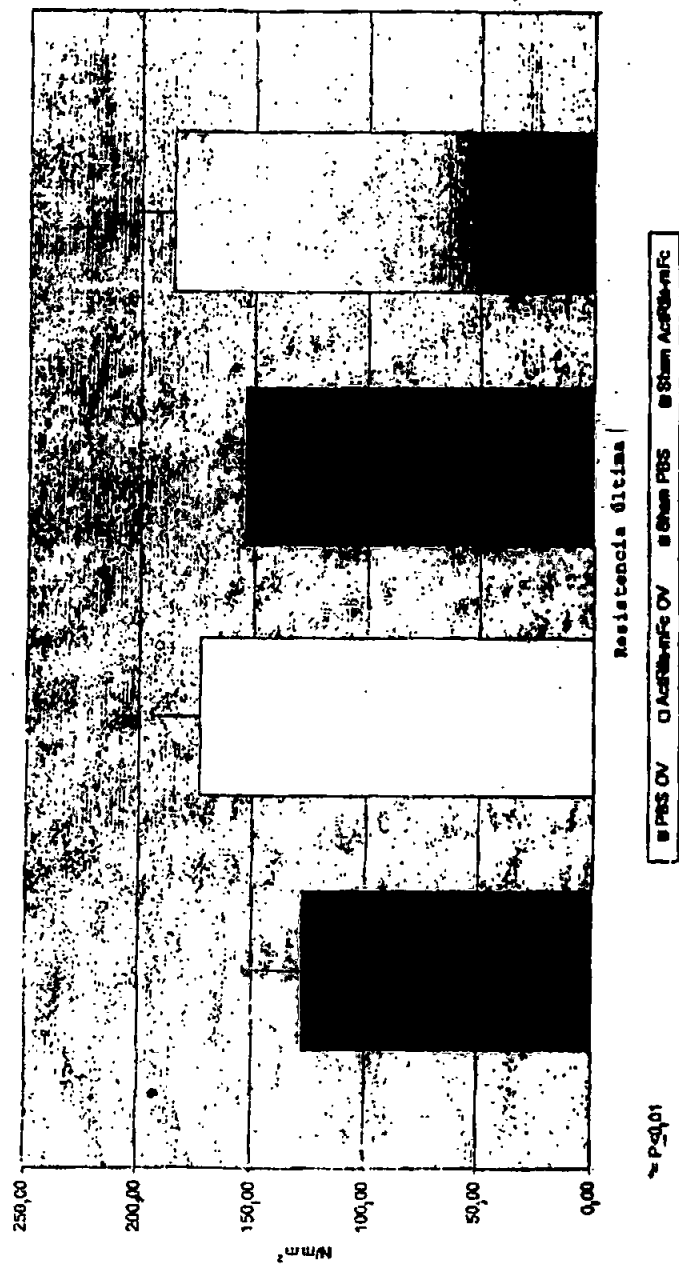
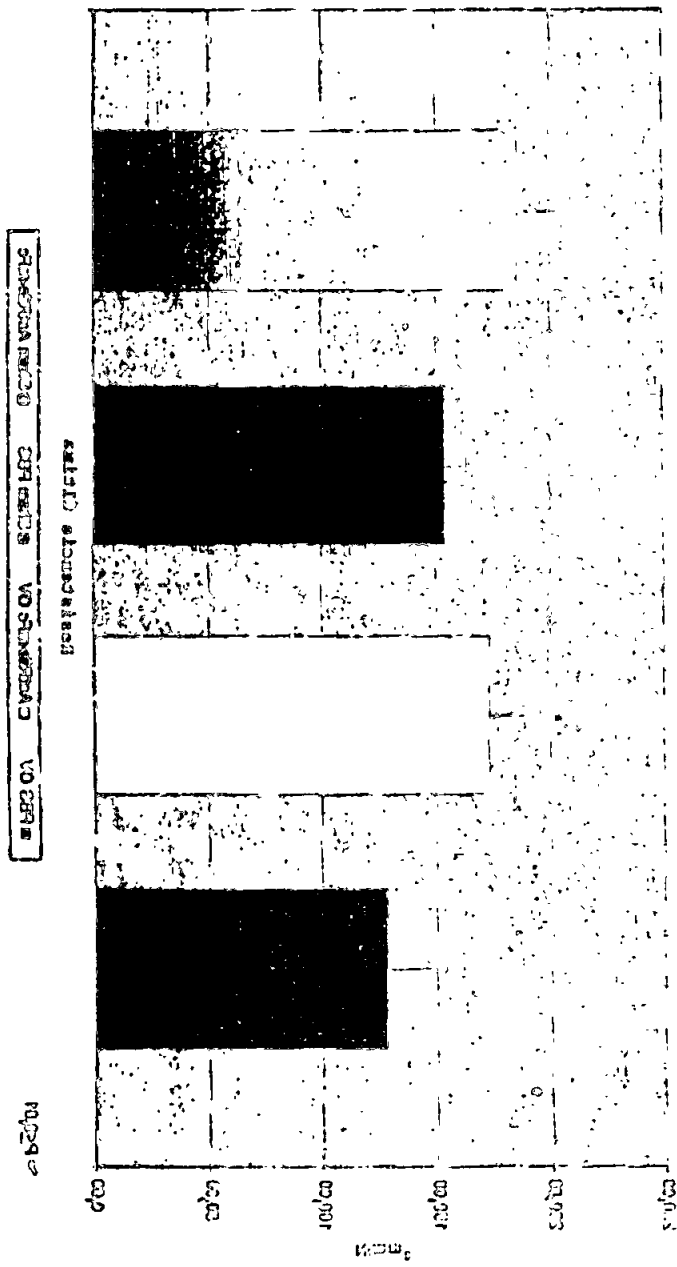
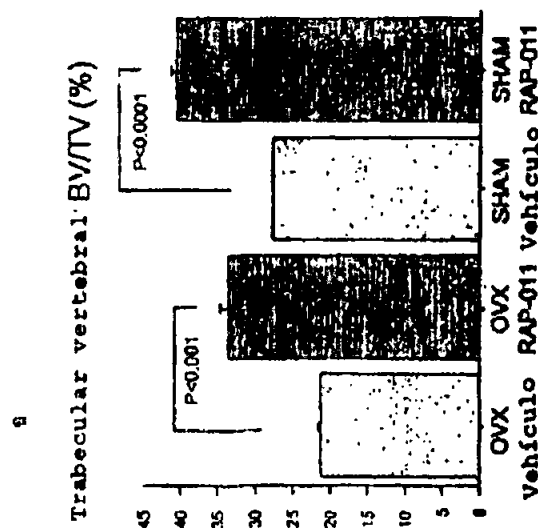
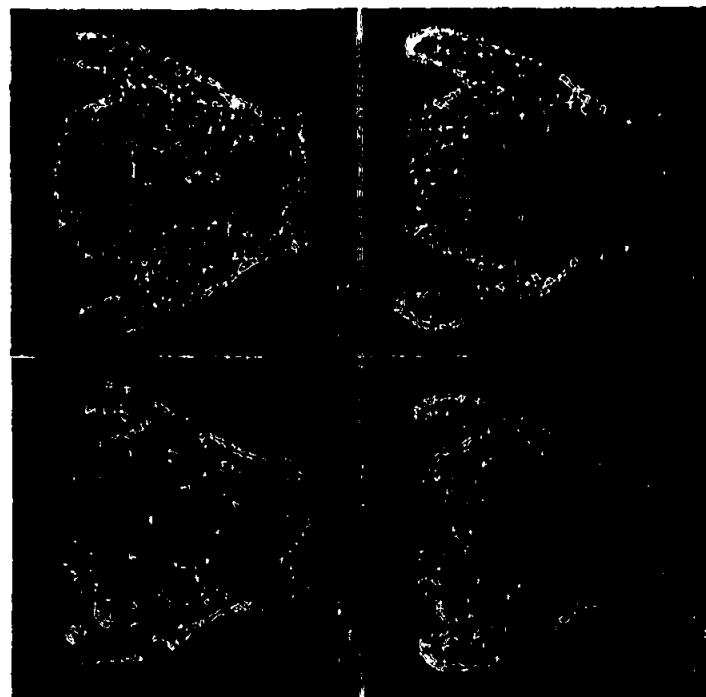


Figura 18

continued on next page



8. கையாண்டு



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

Figura 19

Figure 10

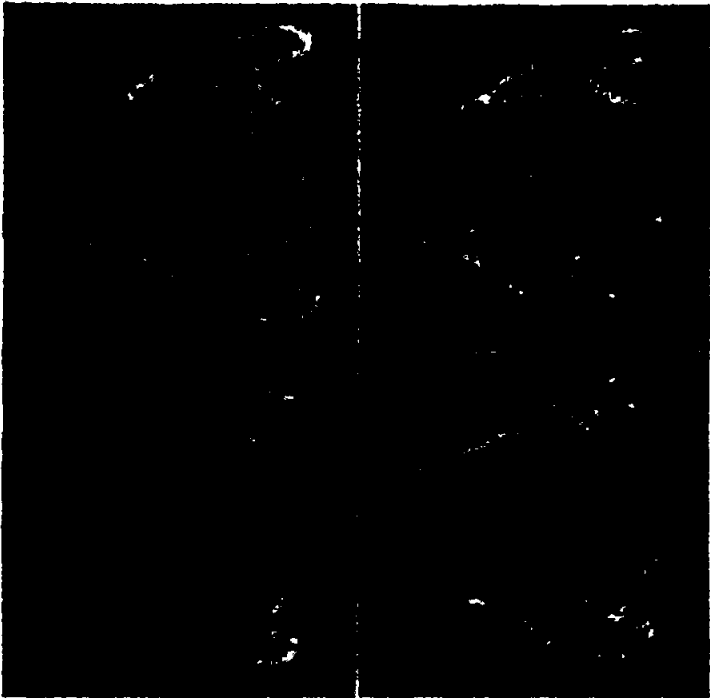
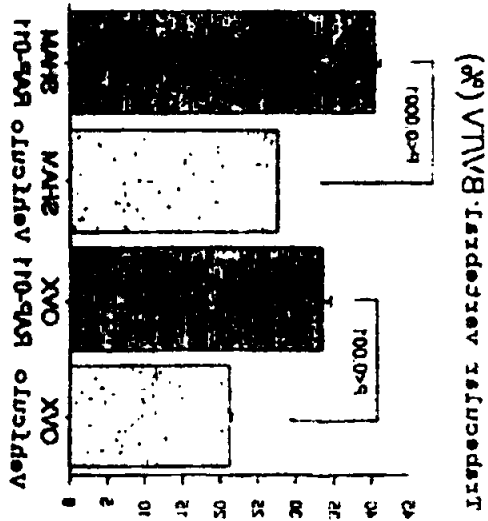
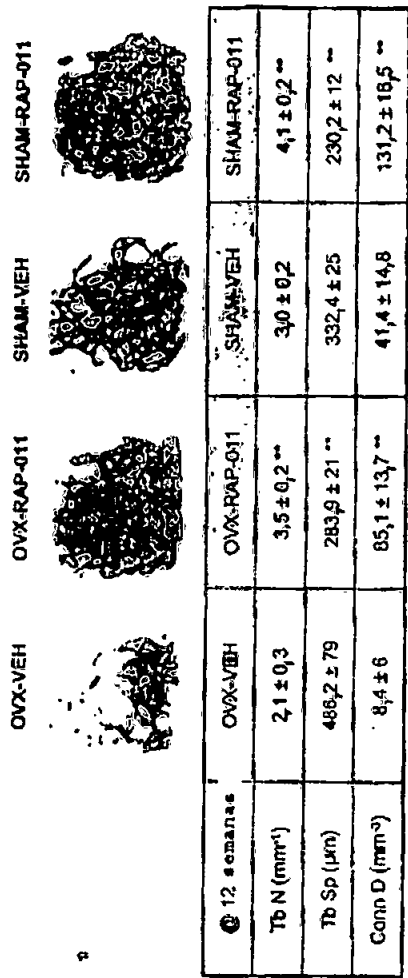


Figure 10 shows the effect of the concentration of the receptor velocity on the VT/VB (x) receptor velocity.



** p < 0,01 vs VEH

Figura 20



ITC-9A9-MAH2	HEV-MAH2	ITC-9A9-XVO	HEV-XVO	assumed ST @
$\approx 50 \pm 1.4$	50 ± 0.5	$\approx 50 \pm 2.6$	50 ± 1.5	(1mm) M DT
$\approx 51 \pm 5.05$	55 ± 4.52	$\approx 15 \pm 0.85$	57 ± 5.38	(mij) G2 ST
$\approx 241 \pm 5.16$	841 ± 4.14	$\approx 141 \pm 1.28$	8 ± 4.8	(1mm) G nico

HEV no 10,0 ng

02 610015

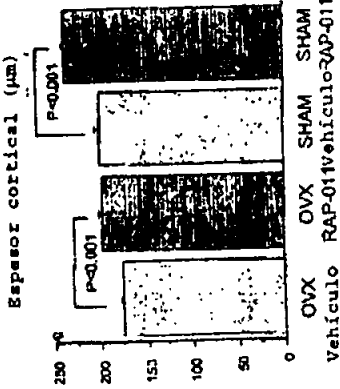
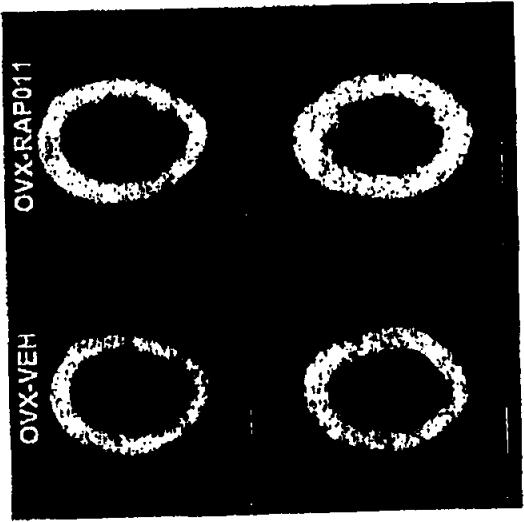


Figura 21

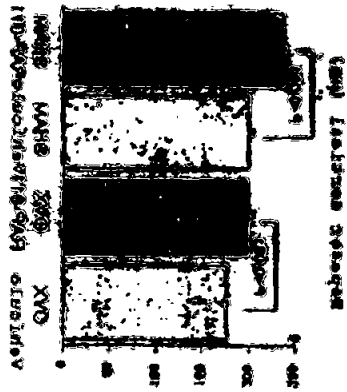
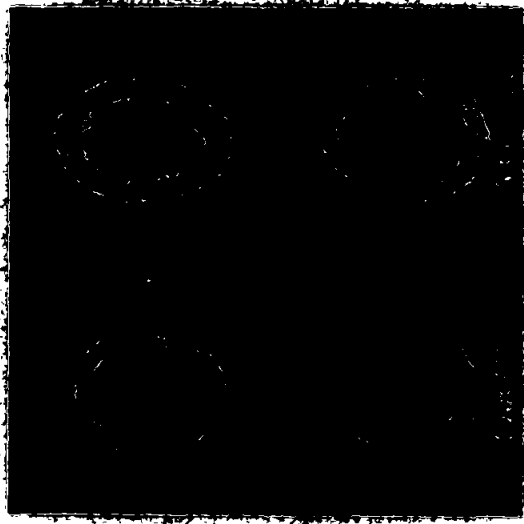


Figure 51

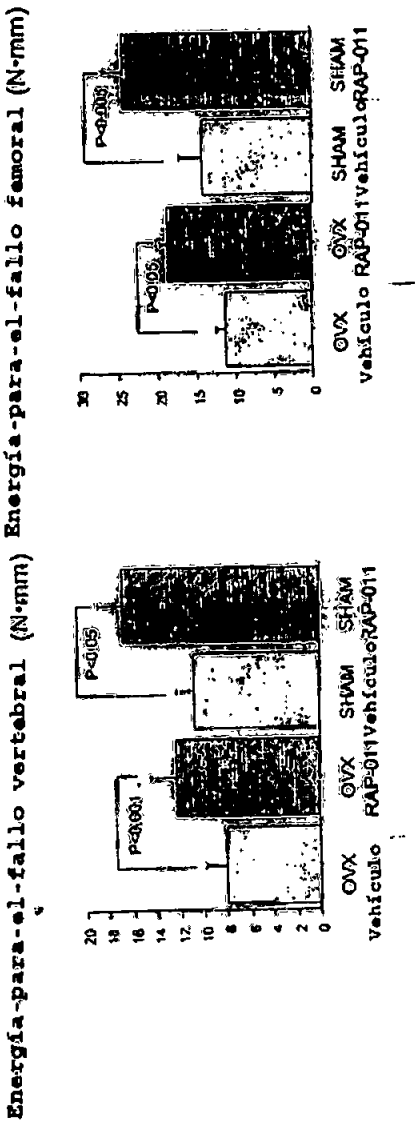


Figura 22

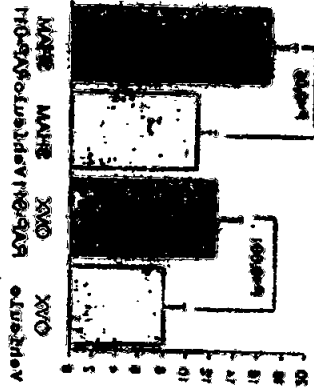
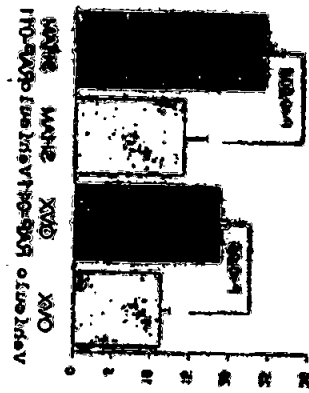


Figura 22

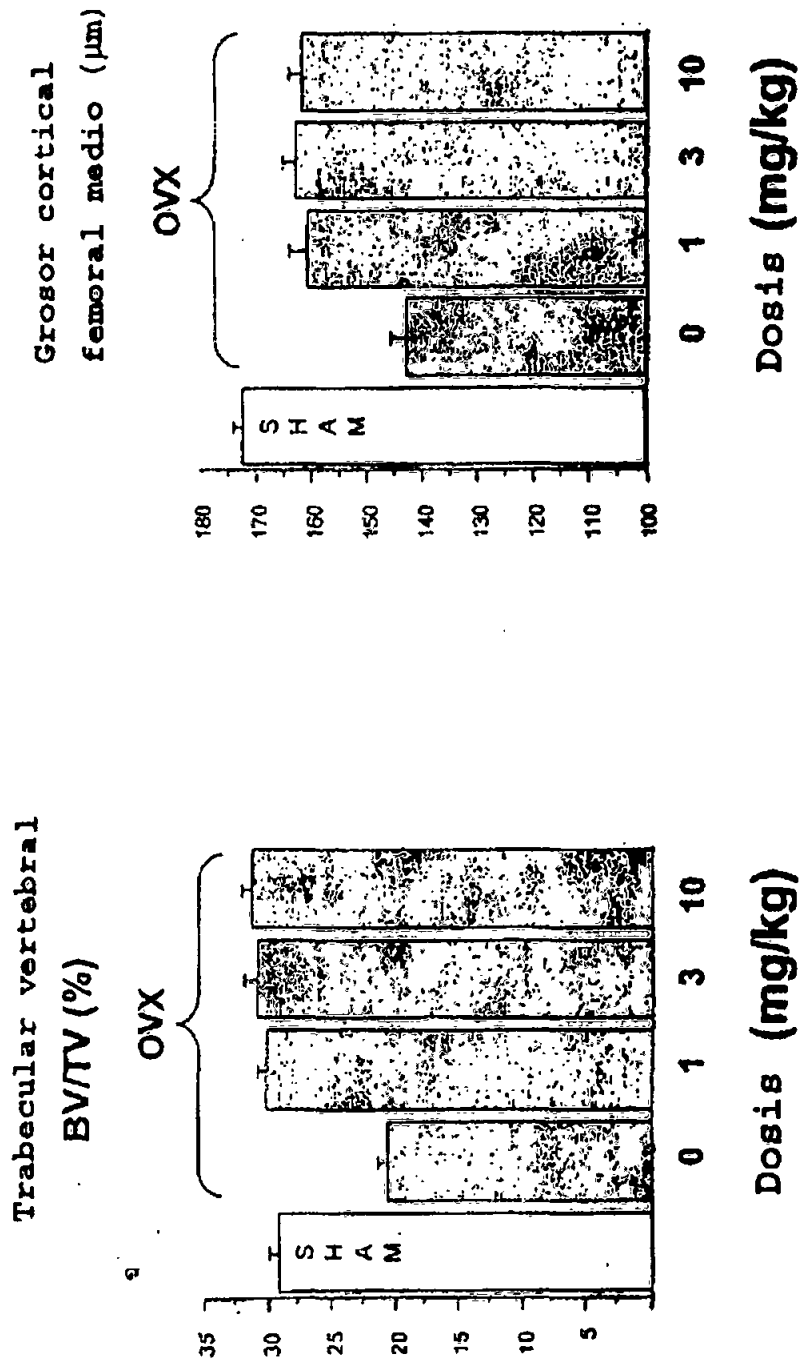
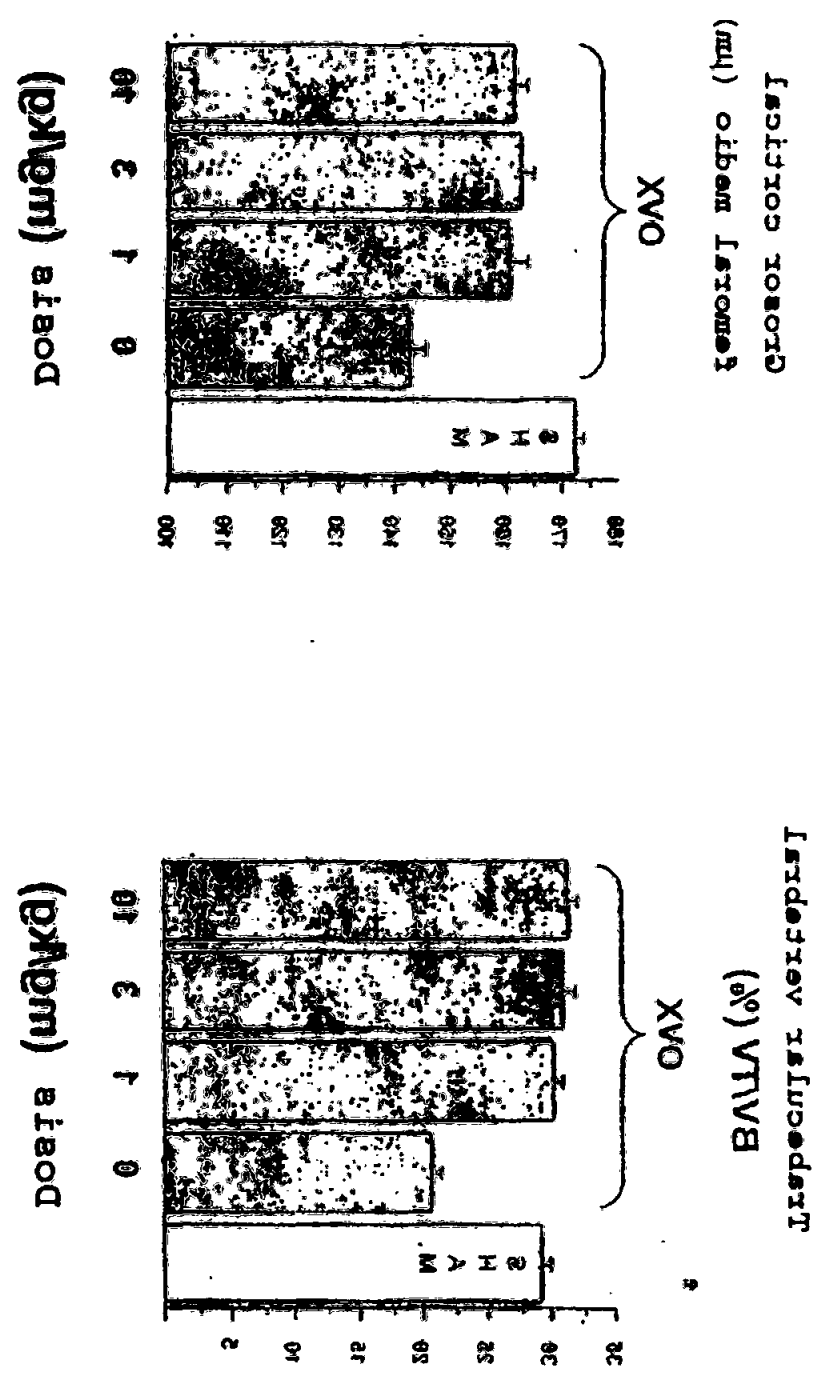


Figura 23

Figures 33



	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/BS (%)	MAR (um/day)	BFR/BSd (um ³ /um ² /day)
PBS media	7,53	17,36	49,33	7,55	4,206	0,704	0,029
RAP-011 media	10,88	13,93	40,89	5,34	7,546	0,852	0,065
Valor de P	0,002	0,03	0,02	0,01	0,008	0,03	0,002

Figura 24

DEBIT (Yrly Maint Fee)	PLAN (Volume)	ANNUAL (Yrly)	REVENUE (Yrly)	REVENUE (Yrly)	DEBIT (Yrly)	VTIVE (Yrly)	
250.0	401.0	205.4	22.5	22.04	22.5	22.5	above 209
250.0	550.0	242.5	42.2	22.04	22.5	22.01	above 170-242
500.0	0.0	800.0	10.0	50.0	0.0	500.0	9 ab volav

Figure 34

