



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 890**

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03773145 .2**

96 Fecha de presentación : **24.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1572961**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Polipéptidos de fusión ActRIIB y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **25.10.2002 US 421041 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2010

73 Titular/es: **WYETH L.L.C.**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

72 Inventor/es: **Wolfman, Neil, M. y**
Bouxsein, Mary, L.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 337 890 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de fusión ActRIIB y usos de los mismos.

5 **Campo técnico**

Este campo técnico se relaciona con inhibidores del factor-8 de crecimiento y de diferenciación (GDF-8), incluyendo formas solubles de los receptores de activina tipo II, y fragmentos de estos, especialmente aquellos que inhiben la actividad de GDF-8 *in vivo*. El campo además se relaciona con métodos para prevenir, o tratar trastornos degenerativos de los huesos.

Antecedentes

15 La familia TGF- β es un número de factores de crecimiento relacionados estructuralmente, de los cuales todos poseen propiedades morfogenéticas y reguladoras del crecimiento importantes fisiológicamente (Kingsley *et al.* (1994) Genes Dev., 8:133-146; Hoodless *et al.* (1998) Curr. Topics Microbiol. Immunol., 228:235-272). Estos factores incluyen proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), activina, inhibina, sustancia inhibidora de müller, factor neurotrófico derivado de las células gliales, e incluso un número creciente de factores de diferenciación y de crecimiento (GDF),
20 tales como GDF-8. Muchas de estas proteínas son altamente homólogas. Por ejemplo, BMP-11 humano, también conocido como GDF-11, es 90% idéntica a GDF-8 en el nivel de aminoácido (Gamer *et al.* (1999) Dev. Biol. 208:222-232; <http://www.ronmyrick.com> Nakashima *et al.* (1999) Mech. Dev. 80:185-189).

La mayoría de los miembros de la familia TGF- β se conocen por transducir sus señales a través de la formación de complejos heteroméricos de dos diferentes tipos de receptores quinasa serina/treonina expresados en la superficie celular, i.e., receptores tipo I de aproximadamente 50-55 kDa y receptores tipo II de más de 70 kDa. Los receptores tipo I no unen los ligandos directamente; más bien, participan en la transducción de la señal por asociación con los receptores tipo II, que unen moléculas ligando. El sistema TGF- β se conserva altamente en todo el reino animal. (Para una revisión del sistema TGF- β , ver Massague (2000) Nature Rev. Mol. Cell Biol. 1:16-178; and Moustakas *et al.*
25 (2001) J. Cell Sci. 114:4359-4369).

El receptor de activina tipo II se ha descrito previamente en U.S. Patent No. 5,885,794. La activina originalmente se purificó a partir de fluido folicular de los ovarios como una proteína que tiene un efecto estimulador en la producción de hormonas que estimulan el folículo en la glándula pituitaria. Cinco isoformas del receptor de activina tipo II han sido identificadas en las células sensibles a la activina. Basándose en estudios *in vitro*, estos receptores pueden ser compartidos por miembros de la familia TGF- β (Attisano *et al.* (1996) Mol. Cell. Biol. 16:1066-1073). La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el receptor de activina tipo II, denominado ActRIIB, se puede unir al factor-8 de crecimiento y de diferenciación (GDF-8) además a la activina.

40 GDF-8 está implicado en la regulación de procesos biológicos críticos en el músculo esquelético y la osteogénesis. GDF-8 se expresa altamente en el músculo esquelético en adultos y en el desarrollo. Los ratones transgénicos carentes de GDF-8 se caracterizan por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron *et al.* (1997) Nature 387:83-90) y una estructura del hueso cortical alterada (Hamrick *et al.* (2000) Bone 27 (3):343-349). Incrementos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones de GDF-8 que ocurren naturalmente en ganado (Ashmore *et al.* (1974) Growth 38:501-507; Swatland *et al.* (1994) J. Anim. Sci. 38:752-757; McPherron
45 *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12457-12461; and Kambadur *et al.* (1997) Genome Res. 7:910-915). Los estudios han indicado que la atrofia muscular asociada con la infección por HIV se acompaña por un aumento en la expresión de GDF-8 (Gonzalez-Cadavid *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 14938-14943). GDF-8 también ha sido implicado en la producción de enzimas musculares específicas (por ejemplo, la creatina quinasa) y la proliferación de células mioblásticas (WO 00/43781). Además de sus propiedades reguladoras del crecimiento y morfogenéticas, GDF-8 también puede estar implicado en un número de otros procesos fisiológicos, incluyendo homeostasis de la glucosa en el desarrollo de diabetes tipo II, tolerancia a la glucosa deteriorada, síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por trauma tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno, y trastornos del tejido adiposo, tales como obesidad (Kim *et al.* (2001) BBRC 281:902-906).

55 Un número de trastornos humanos y animales se asocian con tejido muscular deteriorado funcionalmente, por ejemplo, distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular, atrofia orgánica, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, y síndrome de atrofia muscular causados por otras enfermedades y condiciones. A la fecha, muy pocas terapias confiables o efectivas han sido desarrolladas para tratar estos trastornos.

También hay un número de condiciones asociadas con una pérdida de hueso, que incluyen osteoporosis y osteoartritis, especialmente en las mujeres mayores y/o posmenopáusicas. Además, las enfermedades de hueso metabólicas y trastornos incluyen, masa ósea baja debido a terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. En la actualidad las terapias disponibles para estas condiciones funcionan inhibiendo la resorción ósea. Una terapia que promueve la formación de hueso nuevo, sería una alternativa deseable para estas terapias.

ES 2 337 890 T3

Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevas terapias que contribuyan a un aumento global de masa muscular y/o densidad ósea, especialmente, en humanos. Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos terapéuticos seguros y efectivos para trastornos asociados con los huesos. Es otro objeto de la invención proporcionar métodos para aumentar la densidad ósea en mamíferos. Incluso otro objeto de la invención es proporcionar inhibidores de GDF-8 que sean seguros y efectivos *in vivo*.

Incluso otro objeto de la invención es proporcionar formas solubles del receptor de activina tipo II ActRIIB y/o fragmentos funcionales de estos que son estables *in vivo* y se unen a GDF-8 con alta especificidad y afinidad. WO 02/10214 describe un receptor del factor de diferenciación de crecimiento (GDF) sustancialmente purificado, incluyendo un receptor GDF-8 para el tratamiento de condiciones patológicas relacionadas con tejido muscular o adiposo.

Los objetos adicionales de la invención serán establecidos en parte en la descripción que sigue, y en parte será evidente de la descripción o pueden ser adquiridos por la práctica de la invención.

Varios objetos, aspectos y ventajas de la invención serán realizados y logrados por medio de los elementos y combinaciones particularmente señaladas en las reivindicaciones anexas.

Resumen

En consecuencia, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de fusión del receptor de Activina tipo IIB (ActRIIB) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno degenerativo óseo en un mamífero, en donde el polipéptido de fusión ActRIIB comprende (a) una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a los aminoácidos 23 a 138 de SEQ ID NO:3 y es capaz de unirse al factor-8 de crecimiento y de diferenciación (GDF-8) y (b) la región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgE, o IgM.

La invención también proporciona una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

La invención además proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de la invención, un vector de expresión, que comprende el ácido nucleico de la invención y una célula huésped que comprende el vector de la invención.

La invención adicionalmente proporciona un método para identificar los inhibidores de GDF 8, que comprende:

(a) la preparación de una primera mezcla de enlace que comprende el polipéptido de fusión ActRIIB de la invención y GDF-8;

(b) la medición de la cantidad de enlace entre el polipéptido de fusión ActRIIB y GDF-8 en la primera mezcla;

(c) la preparación de una segunda mezcla de enlace que comprende el polipéptido de fusión ActRIIB, GDF-8 y un compuesto de prueba; y

(d) la medición de la cantidad de enlace entre el polipéptido de fusión ActRIIB y GDF-8 en la segunda mezcla.

Además se proporciona por la invención el uso de un polipéptido de fusión ActRIIB en la fabricación de un medicamento para aumentar la densidad ósea trabecular, en donde el polipéptido de fusión ActRIIB comprende (a) una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a los aminoácidos 23 a 138 de SEQ ID NO:3 y es capaz de unirse al factor-8 de crecimiento y de diferenciación (GDF-8) y (b) la región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgE, o IgM.

Los métodos para tratar trastornos degenerativos óseos se describen aquí. Los métodos también son útiles para aumentar la densidad ósea en animales normales.

También se describen los métodos para inhibir la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de densidad ósea.

Se proporcionan las formas de ActRIIB solubles estabilizadas y los fragmentos de estas que se unen e inhiben GDF-8 *in vitro* e *in vivo*. En la actualidad las formas de ActRIIB solubles reveladas poseen propiedades farmacocinéticas que las hacen apropiadas como agentes terapéuticos.

Otros aspectos proporcionan composiciones que contienen los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en la actualidad y su uso en métodos para inhibir o neutralizar GDF-8, incluyendo métodos de tratamiento de los seres humanos o animales. Los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados pueden ser utilizados para tratar o prevenir condiciones en las cuales un aumento en la densidad ósea es deseable. Enfermedades y trastornos ejemplares incluyen enfermedad degenerativa ósea tales como osteoartritis y osteoporosis. Las formas de ActRIIB modificadas utilizadas en los métodos de la invención, por lo tanto, son polipéptidos de fusión de ActRIIB que comprenden (a) una primera secuencia de aminoácidos derivada del dominio extracelular de ActRIIB y (b) una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la región constante de un anticuerpo.

ES 2 337 890 T3

La primera secuencia puede comprender toda o una porción de un dominio extracelular de humano ActRIIB, o puede ser una mutación de dicha secuencia. La segunda secuencia puede ser derivada de la porción Fc de un anticuerpo, o puede ser una mutación de dicha secuencia.

5 La segunda secuencia se puede unir al C-terminal o al N-terminal de la primera secuencia de aminoácidos, con o sin estar unida por una secuencia ligadora.

10 Los métodos terapéuticos para tratar trastornos degenerativos óseos también se describen. Enfermedades y trastornos ejemplares incluyen enfermedad degenerativa ósea tal como osteoporosis.

Además, los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad, pueden ser utilizados como una herramienta de diagnóstico para detectar cuantitativa o cualitativamente GDF-8 o fragmentos de este, en una muestra biológica. La presencia o cantidad de GDF-8 detectada puede ser correlacionada con uno o más de las condiciones médicas enumeradas anteriormente.

15 Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de fusión ActRIIB utilizado en los métodos de la invención también se proporciona. Además se proporcionan vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico; las células huésped que comprenden los vectores de expresión; y los métodos para producir el ácido nucleico.

20 Incluso otro aspecto, proporciona un método para identificar agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de trastornos musculares y óseos.

Se debe entender que ambas la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas solamente y no son limitantes de la invención, según se reivindica.

25 Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra el enlace de GDF-8 biotinilado y BMP-11 con ActRIIB-Fc.

30 Figura 2 muestra los resultados de ensayos de gen indicador en los cuales ActRIIB-Fc ha sido probado.

Figura 3 muestra los resultados de un estudio farmacocinético en el cual ratones C57B6/SCID que utilizan una única administración intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP) de ActRIIB-Fc.

35 Breve descripción de las secuencias

La siguiente tabla se proporciona como una referencia para las secuencias referidas en esta aplicación.

Referencia	Tipo*	Secuencia
SEQ ID NO:1	AA	ActRIIB
SEQ ID NO:2	AA	GDF-8
SEQ ID NO:3	AA	ActRIIB-Fc
SEQ ID NO:4	ADN	Codifica SEQ ID NO:3
SEQ ID NO:5	AA	Ligador
SEQ ID NO:6	AA	Sitio de corte de enteroquinasa
*AA = aminoácido		

Descripción detallada

55 1. Definiciones

60 El término "ActRIIB" se refiere a cualquier isoforma del receptor de activina tipo II o un fragmento de este que es capaz de unirse específicamente a GDF-8. El término no se limita a cualquier especie particular de origen, método de producción, y otras características de ActRIIB. El término incluye ActRIIB producido recombinantemente o sus fragmentos, y particularmente, el dominio de enlace de GDF-8 de ActRIIB humano. El término también abarca variantes de empalme y alélicas de ActRIIB, sus homólogos, y ortólogos y secuencias de estos que contienen mutaciones introducidas (sustituciones, adiciones, o deleciones), por ejemplo, aquellos introducidos por técnicas recombinantes.

65 El término "trastorno degenerativo de músculos, huesos, o homeostasis de la glucosa" se refiere a un número de trastornos y enfermedades asociadas con GDF-8 y/o otros miembros de la superfamilia TGF- β , por ejemplo, BMP-11. Ejemplo de tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, trastornos metabólicos tales como diabetes tipo II, tolerancia a la glucosa deteriorada, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), y resistencia a la insulina inducida por

ES 2 337 890 T3

trauma (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno); trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia orgánica; fragilidad; síndrome del canal carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; y sarcopenia, caquexia y otros síndromes de atrofia muscular. Otros ejemplos incluyen osteoporosis, especialmente en las mujeres mayores y/o posmenopáusicas; osteoporosis inducida por los glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; y fracturas relacionadas con la osteoporosis. Incluso otros ejemplos incluyen masa ósea baja debido a terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa.

El término “cantidad efectiva” se refiere a aquella cantidad del compuesto que se traduce en mejoría de los síntomas en un paciente o un resultado biológico deseado (por ejemplo, aumento de la masa del músculo esquelético y/o densidad ósea). Tal cantidad debería ser suficiente para reducir la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de masa del músculo esquelético y la densidad ósea. La cantidad efectiva se puede determinar como se describe en las posteriores secciones.

El término “dominio de enlace de GDF-8” cuando se utiliza en relación con ActRIIB, se refiere al dominio extracelular de ActRIIB o una parte de estos necesaria para unirse a GDF-8, i.e., una porción del dominio extracelular ActRIIB responsable para el enlace específico con GDF-8.

El término “superfamilia TGF- β ” se refiere a una familia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados. Esta familia de factores de crecimiento relacionados es bien conocida en el oficio (Kingsley *et al.* (1994) *Genes Dev.* 8:133-146; Hoodless *et al.* (1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 228:235-72). La superfamilia TGF- β incluye proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), activina, inhibina, sustancia inhibidora de müller, factor neurotrófico derivado de gliales, e incluso un número creciente de factores de diferenciación y de crecimiento (GDF), tales como GDF-8 (miostatina). Muchas de dichas proteínas son estructuralmente y/o funcionalmente relacionadas con GDF-8. Por ejemplo, BMP-11 humano, también conocido como GDF-11, es 90% idéntica a GDF-8 en el nivel de aminoácido (Gamer *et al.* (1999) *Dev. Biol.* 208:222-232; Nakashima *et al.* (1999) *Mech. Dev.* 80:185-189).

El término “GDF-8” se refiere a un factor-8 específico de crecimiento y de diferenciación. El término se refiere a la forma de GDF-8 precursora sin procesar de longitud completa, así como los polipéptidos maduros y propéptido resultantes de la división postraduccional. El término también se refiere a cualquiera de los fragmentos y las variantes de GDF-8 que retienen una o más actividades biológicas asociadas con GDF-8 como se discute aquí. La secuencia de aminoácidos de GDF-8 humano maduro se proporciona en SEQ ID NO:2. La presente invención se relaciona con GDF-8 de todas las especies de vertebrados, incluyendo, pero no limitando a, humano, bovino, pollos, murino, rata, porcino, ovino, pavo, babuino, y peces (para información de la secuencia, ver, por ejemplo, McPherron *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12457-12461).

El término “GDF-8 maduro” se refiere a la proteína que se divide del dominio carboxi-terminal de la proteína precursora de GDF-8. El GDF-8 maduro puede estar presente como un monómero, homodímero, o en un complejo latente de GDF-8. Dependiendo de las condiciones, GDF-8 maduro puede establecer el equilibrio entre cualquiera o todos de estos polipéptidos diferentes. En su forma biológicamente activa, el GDF-8 maduro también se refiere como “GDF-8 activo”.

El término “propéptido de GDF-8” se refiere al polipéptido que se divide del dominio amino-terminal de la proteína precursora de GDF-8. El propéptido GDF-8 es capaz de unirse al dominio de enlace del propéptido en el GDF-8 maduro.

El término “complejo latente de GDF-8” se refiere al complejo de proteínas formado entre el homodímero de GDF-8 maduro y el propéptido de GDF-8. Se cree que dos propéptidos de GDF-8 asociados con las dos moléculas de GDF-8 maduro en el homodímero para formar un complejo tetramérico inactivo. El complejo latente puede incluir otros inhibidores de GDF-8 en lugar de o además de uno o ambos de los propéptidos de GDF-8.

El término “actividad de GDF-8” se refiere a una o más de actividades morfogenéticas o del crecimiento fisiológicamente reguladoras, asociadas con la proteína del GDF-8 activo. Por ejemplo, GDF-8 activo es un regulador negativo del músculo esquelético. El GDF-8 activo también puede modular la producción de enzimas musculares específicas (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos, y modular la diferenciación de preadipocitos con los adipocitos. Los procedimientos para evaluar la actividad de GDF-8 *in vivo* e *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ensayos de gen indicador (ver Ejemplo 6) o pruebas *in vivo* que involucran mediciones de parámetros de músculo y/o hueso (ver Ejemplos 8, 9, y 10).

El término “porción Fc” se refiere al fragmento C-terminal de una inmunoglobulina generada por la proteólisis con papaina, o un equivalente funcional derivado de esta. El término “porción Fc” se debería entender que abarca los fragmentos Fc producidos recombinantemente, incluyendo aquellos derivados de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM, y cualquiera de las subclases del isotipo. El término “región constante de un anticuerpo” se refiere a una porción C-terminal de una inmunoglobulina, que comprende la porción Fc y las secuencias adyacentes en la medida que estas secuencias no incluyan regiones variables del anticuerpo, tales como regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). La región constante de un anticuerpo es la misma en todos los anticuerpos de un isotipo particular.

Como se utiliza en este documento, el término “hibridación bajo condiciones estrictas” tiene la intención de describir las condiciones para la hibridación y lavados en los que las secuencias de nucleótidos que son significativamente idénticas u homólogas entre sí, permanecen unidas complementariamente entre sí. Las condiciones son tales que las secuencias al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85-90% idénticas sigan unidas entre sí. El porcentaje de identidad se determina como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Condiciones estrictas se conocen en el oficio y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (eds. Ausubel *et al.* 1995), sections 2, 4, and 6. Adicionalmente, condiciones estrictas se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, chapters 7, 9, and 11. Un ejemplo de condiciones de hibridación estrictas es hibridación en 4X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 65-70°C o hibridación en 4X SSC más 50% de formamida a aproximadamente 42-50°C, seguido por uno o más lavados en 1X SSC, a aproximadamente 65-70°C. Cuando se utiliza membranas de nylon, por ejemplo, un ejemplo adicional no-limitante de condiciones de hibridación estrictas es la hibridación en NaH₂PO₄ 0.25-0.5 M, 7% de SDS a aproximadamente 65°C, seguido por uno o más lavados en NaH₂PO₄ 0.02 M, 1% de SDS a 65°C. Ver, por ejemplo, Church *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:1991-1995. Será entendido que se pueden adicionar reactivos adicionales a la hibridación y/o soluciones reguladoras de lavado, por ejemplo, agentes de bloqueo (BSA o ADN de esperma de salmón), detergentes (SDS), agentes quelantes (EDTA), Ficoll, PVP, etc.

El término “inhibidor”, cuando se utiliza en relación con GDF-8 o su actividad, incluye cualquier agente capaz de inhibir la actividad, expresión, procedimiento, o secreción de GDF-8. Tales inhibidores incluyen proteínas, anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos, ribozimas, oligonucleótidos anti-sentido, ARN bicatenario, y otras moléculas pequeñas, que inhiben GDF-8. Se dice que tales inhibidores “inhiben”, “neutralizan”, o “reducen” la actividad biológica de la proteína de GDF-8.

Los términos “neutralizar”, “neutralización”, “inhibitorio”, y sus afines se refieren a una reducción en la actividad de GDF-8 por un inhibidor de GDF-8, relativa a la actividad de GDF-8 en la ausencia del mismo inhibidor. La reducción en actividad es preferiblemente al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más.

El término “aislado” se refiere a una molécula que es sustancialmente libre de su ambiente natural. Por ejemplo, una proteína aislada es sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente de célula o tejido del cual se deriva. El término se refiere a preparaciones donde la proteína aislada es suficientemente pura que se administra como una composición terapéutica o al menos 70% a 80% (peso/peso) pura, al menos 80%-90% pura, 90-95% pura; o al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% pura.

El término “mamífero” se refiere a cualquier animal clasificado como tal, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, deportivos, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc.

El término “interacción específica”, o “unido específicamente”, o similares, significa que dos moléculas forman un complejo que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. El término es también aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de enlace-antígeno es específico por un epítopo particular, que se lleva por un número de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que lleva el dominio de enlace-antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que llevan el epítopo. Por lo tanto, un anticuerpo se puede unir específicamente, por ejemplo, BMP-11 y GDF-8 siempre que se una al epítopo, que se lleva por ambos.

El enlace específico se caracteriza por una alta afinidad y una baja a moderada capacidad. El enlace no-específico usualmente tiene una baja afinidad con una moderada a alta capacidad. Por lo general, el enlace se considera específico cuando la afinidad constante K_a es superior de 10^6 M^{-1} , o preferiblemente más alta de 10^8 M^{-1} . Si es necesario, el enlace no-específico se puede reducir sin afectar sustancialmente el enlace específico variando las condiciones de enlace. Tales condiciones se conocen en el oficio, y un experto utilizando técnicas rutinarias puede seleccionar las condiciones apropiadas. Las condiciones usualmente se definen en términos de concentración del polipéptido de fusión ActRIIB, fuerza iónica de la solución, temperatura, tiempo permitido para unir, concentración de moléculas no-relacionadas (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de leche), etc. Condiciones ejemplares se establecen en los Ejemplos 5 y 6.

La frase “sustancialmente según se presenta” significa que una secuencia de aminoácidos pertinente es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una secuencia dada. A modo de ejemplo, tales secuencias pueden ser variantes derivadas de diversas especies, o pueden ser derivadas de la secuencia dada por truncamiento, delección, sustitución o adición de aminoácidos. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por algoritmos de alineación estándar tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, el algoritmo de Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453, o el algoritmo de Meyers *et al.* (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17.

El término “tratamiento” se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como un tratamiento profiláctico/preventivo. Aquellos con necesidad de tratamiento pueden incluir a individuos que ya tienen un trastorno médico particular así como aquellos que pueden adquirir en última instancia el trastorno (i.e., aquellos que necesitan medidas preventivas,

tales como, por ejemplo, mujeres posmenopáusicas con una historia familiar de osteoporosis, o pacientes obesos con una historia familiar de diabetes tipo II o algunas lecturas elevadas de azúcar en sangre).

5 II. Polipéptidos de Fusión ActRIIB

Se describe aquí un receptor de activina tipo II ActRIIB modificado que se une a GDF-8 e inhibe su actividad *in vitro* y/o *in vivo*. En particular, los polipéptidos de fusión ActRIIB, revelados en la actualidad inhiben la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de masa del músculo esquelético y la densidad ósea. Los polipéptidos de fusión ActRIIB descritos en este documento son solubles y poseen propiedades farmacocinéticas, que los hacen apropiados para uso terapéutico, por ejemplo, vida media circulatoria extendida y/o protección mejorada a partir de la degradación proteolítica.

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento comprenden (a) una primera secuencia de aminoácidos derivada del dominio extracelular de ActRIIB y (b) una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la región constante de un anticuerpo. El aminoácido completo y las secuencias de ADN de una modalidad ilustrativa particular de la proteína de fusión de ActRIIB se establecen en SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, respectivamente.

La primera secuencia de aminoácidos se deriva de toda o una porción del dominio extracelular de ActRIIB y es capaz de unirse a GDF-8 específicamente. Dicha porción del dominio extracelular de ActRIIB también se puede unir a BMP-11 y/o activina, u otros factores de crecimiento. La primera secuencia de aminoácidos puede ser idéntica a o sustancialmente según se presenta en SEQ ID NO:3 del aminoácido (aa) 23 al aa 138 o de aa 19 al aa 134 en SEQ ID NO:1. La diferencia entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 es que aa 64 de SEQ ID NO:1 es Ala, mientras que el correspondiente aa 68 en SEQ ID NO:3 es Arg. Adicionalmente, otras variaciones en la secuencia de ActRIIB son posibles, por ejemplo, aa 16 y aa 17 en SEQ ID NO:1 pueden ser sustituidos con Cys y Ala, respectivamente. La primera secuencia de aminoácidos puede comprender al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, o 120 aminoácidos continuos de aa 23 y aa 138 de SEQ ID NO:3 o aa 19 y aa 134 de SEQ ID NO:1. Dicha secuencia se puede truncar en la medida que la secuencia truncada sea capaz de unirse específicamente a GDF-8. El enlace con GDF-8 se puede probar utilizando métodos conocido en el oficio o como se describe en los Ejemplos 5 y 6.

La segunda secuencia de aminoácidos se deriva de la región constante de un anticuerpo, particularmente la porción Fc, o es una mutación de dicha secuencia. La segunda secuencia de aminoácidos puede ser derivada de la porción Fc de una IgG. La porción Fc puede ser derivada de la IgG que es IgG₁, IgG₄, u otro isotipo de IgG. En una modalidad particular, la segunda secuencia de aminoácidos comprende la porción Fc de IgG₁ humana según se establece en SEQ ID NO:3 (aminoácidos 148 a 378), en donde la porción Fc de IgG₁ humana ha sido modificada para minimizar la función efectora de la porción Fc. Tales modificaciones incluyen el cambio de residuos de aminoácidos específicos que pueden alterar una función efectora tal como enlace receptor Fc (Lund *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:2657-2662 and Morgan *et al.* (1995) *Immunology* 86:319-324), o el cambio de la especie a partir de la cual la región constante se deriva. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región C_{H2} de la cadena pesada que reduce la función efectora, i.e., enlace receptor Fc y activación complementaria. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como aquellas descritas en U.S. Patent Nos. 5,624,821 y 5,648,260. En la cadena pesada de IgG₁ o IgG₂, por ejemplo, tales mutaciones se pueden hacer en los residuos de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 234 y 237 en la secuencia de longitud completa de IgG₁ o IgG₂. Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilizan el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la región bisagra de IgG₄, como se revela en Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108.

La segunda secuencia de aminoácidos se puede unir al C-terminal o al N-terminal de la primera secuencia de aminoácidos, con o sin estar unida por una secuencia ligadora. La longitud exacta y la secuencia del ligador y su orientación relativa a las secuencias ligadas, puede variar. El ligador puede ser, por ejemplo, (Gly-Ser)₂ (SEQ ID NO:5). El ligador puede comprender 2, 10, 20, 30, o más aminoácidos y se selecciona basándose en las propiedades deseadas tales como solubilidad, longitud y separación estérica, inmunogenecidad, etc. El ligador puede comprender una secuencia de un sitio de corte proteolítico, tal como la sitio de corte de la enteroquinasa Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO:6), u otras secuencias funcionales útiles, por ejemplo, para purificación, detección, o modificación de la proteína de fusión.

Será entendido por alguien de habilidad en el oficio que ciertos aminoácidos en una secuencia de cualquier proteína pueden ser sustituidos por otros aminoácidos sin afectar adversamente la actividad de la proteína. Por lo tanto, se contempla que diversos cambios se pueden hacer en las secuencias de aminoácidos de la secuencia de los polipéptidos de fusión ActRIIB descritos en este documento, o secuencias de ADN que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica o utilidad. La actividad biológica de ActRIIB se puede medir como se describe en los Ejemplos 6-10. Tales cambios pueden incluir, pero no se limitan a, deleciones, inserciones, truncaciones, y sustituciones.

Las fusiones adicionales de cualquiera de los polipéptidos de fusión ActRIIB descritos en este documento con las secuencias de aminoácidos derivadas de otras proteínas se pueden construir. Las secuencias de fusión deseables pueden ser derivadas de proteínas que tienen actividad biológica diferente de aquellas de ActRIIB, por ejemplo, citoquinas, factores de diferenciación y de crecimiento, enzimas, hormonas, otros componentes receptores, etc. También, los polipéptidos de fusión de ActRIIB, pueden ser acoplados químicamente, o conjugados, con otras proteínas y agentes

ES 2 337 890 T3

farmacéuticos. Tal modificación se puede diseñar para alterar la farmacocinética y/o biodistribución de la composición resultante.

5 Los polipéptidos de fusión ActRIIB descritos en este documento pueden ser glicosilados, pegilados, o unidos a otro polímero no proteínico. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad, se pueden unir a uno de una variedad de polímeros no-proteináceos, por ejemplo, polietileno-glicol, polipropileno glicol, o polioxialquilenos, en la forma establecida en U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; o 4,179,337. Los polipéptidos de fusión de ActRIIB se modifican químicamente por conjugación covalente con un polímero para aumentar su vida media en circulación, por ejemplo. Polímeros ejemplares, y métodos que los unen a los péptidos, también se muestran en U.S. Patent Nos. 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; y 4,609,546.

10 Los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento, pueden ser modificados para tener un patrón de glicosilación alterado (i.e., alterado a partir del patrón de glicosilación original o nativo). Como se utiliza en este documento, "alterado" significa que tiene una o más fracciones carbohidrato suprimidas, y/o que tienen uno o más sitios de glicosilación adicionados a la secuencia original. La adición de sitios de glicosilación al ActRIIB modificado revelado en la actualidad, se puede lograr alterando la secuencia de aminoácidos que contiene secuencias de consenso del sitio de glicosilación bien conocidos en el oficio. Otro medio para aumentar el número de fracciones carbohidrato es por acoplamiento químico o enzimático de los glucósidos con los residuos de aminoácidos. Estos métodos se describen en WO 87/05330, y en Aplin *et al.* (1981) *Crit. Rev. Biochem.* 22:259-306. La eliminación de cualquiera de las fracciones carbohidrato presentes en ActRIIB se puede lograr química o enzimáticamente como se describe por Hakimuddin *et al.* (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52; Edge *et al.* (1981) *Anal. Biochem.* 118:131 y por Thotakura *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350.

15 Los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento también se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Las etiquetas detectables incluyen radiomarcadores tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que se pueden unir a los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento utilizando química convencional conocida en el oficio. Las etiquetas también incluyen etiquetas de enzimas tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Las etiquetas además incluyen fracciones químicas tales como biotina, que pueden ser detectadas vía un enlace con una fracción detectable cognada específica, por ejemplo, avidina marcada.

20 Alguien de habilidad en el oficio reconocerá que los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento pueden ser utilizados para detectar, medir, e inhibir proteínas diferentes de GDF-8, BMP-11, y activina. Ejemplos no limitantes de tales proteínas, por ejemplo, las secuencias de GDF-8 derivadas de diversas especies (ortólogos), se describen en la presente especificación.

III. Ácidos Nucleicos, Clonación y Sistemas de Expresión

25 La presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un ActRIIB soluble, que puede ser utilizado en los métodos de la presente invención. El ácido nucleico comprende una secuencia codificante por al menos un polipéptido de fusión ActRIIB como se describe en este documento. En una modalidad, el ácido nucleico comprende la secuencia, establecido en SEQ ID NO:4. La secuencia de ácido nucleico puede codificar las secuencias de aminoácidos de aa 23 y aa 138 de SEQ ID NO:3 o de aa 19 y aa 134 de SEQ ID NO:1.

30 La divulgación también proporciona las construcciones en la forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención como anteriormente.

35 La divulgación también proporciona una célula huésped, que comprende una o más construcciones como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.3 es en sí misma un aspecto de la presente invención. La producción de los polipéptidos de fusión codificados de ActRIIB se puede lograr por la expresión recombinante de células huésped que contienen el ácido nucleico bajo condiciones de cultivo apropiado. Después de la expresión, un polipéptido de fusión ActRIIB se aísla y/o purifica utilizando cualquier técnica apropiada, a continuación se utiliza, según proceda. Procedimientos ejemplares para la expresión y purificación se presentan en los Ejemplos 3 y 4.

40 Los polipéptidos de fusión específicos de ActRIIB y que codifican moléculas de ácido nucleico y vectores descritos en este documento se pueden obtener, aislar y/o purificar, *por ejemplo*, de su ambiente natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen diferente de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los ácidos nucleicos, de acuerdo con la presente invención, pueden comprender ADN o ARN y pueden ser completa o parcialmente sintéticos. La referencia a una secuencia de nucleótido según se presenta aquí abarca una molécula de ADN con la secuencia determinada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia determinada en la cual U es sustituido por T, a menos que el contexto lo requiera de otra manera.

45 Se describen aquí las secuencias que tienen al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 nucleótidos de largo e hibridizan bajo condiciones estrictas de hibridación al ácido nucleico establecido en SEQ ID NO:4.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Apropriadas células huésped incluyen bacterias, células de mamífero, y levadura y sistemas de baculovirus. Líneas celulares de mamíferos disponibles en el oficio para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster Chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped de bacterias común es *E. coli*. Para otras células apropiadas para producir polipéptidos de fusión de ActRIIB, ver Gene Expression Systems, Academic Press (Fernandez *et al.* eds. 1999). Cualquier línea celular compatible con la presente invención, puede ser utilizada para producir los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento.

Apropiados vectores se pueden seleccionar o construir, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotor, secuencias terminador, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según proceda. Los vectores pueden ser plásmidos o virus, por ejemplo, fago, o fagómido, según proceda. Para otros detalles ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen con detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 2nd ed., John Wiley & Sons (Ausubel *et al.* eds. 1992).

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una célula huésped que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 3. Tal ácido nucleico se puede introducir en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica apropiada. Para las células eucariotas, técnicas apropiadas pueden incluir transfección de fosfato de calcio, DEAE-Dextran, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, técnicas apropiadas pueden incluir transformación de cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

La introducción puede ser seguida causando o permitiendo la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, por el cultivo de células huésped bajo condiciones apropiadas para la expresión del ácido nucleico.

IV. Métodos para Identificar Inhibidores

Incluso otro aspecto de la invención proporciona un método para identificar los inhibidores de GDF 8. Ensayos de detección aprobados, *por ejemplo*, ensayos basados en ELISA, se conocen en el oficio. En tal ensayo de detección, una primera mezcla de enlace se forma combinando un polipéptido de fusión ActRIIB y un ligando, por ejemplo, GDF-8, BMP-11, activina; y la cantidad de enlace en la primera mezcla de enlace (M_0) se determina. Una segunda mezcla de enlace también se forma combinando un polipéptido de fusión ActRIIB, el ligando, y el compuesto o agente que se detecta, y la cantidad de enlace en la segunda mezcla de enlace (M_1) se determina. Las cantidades de enlace en la primera y segunda mezclas de enlace luego se comparan, *por ejemplo*, calculando la relación M_1/M_0 . El compuesto o agente se considera que es capaz de inhibir la señalización de la célula mediada por ActRIIB, si se observa una disminución en enlace en la segunda mezcla de enlace en comparación con la primera mezcla de enlace. La formulación y optimización de mezclas de enlace está dentro del nivel de habilidad en el oficio, tales mezclas de enlace también pueden contener las soluciones reguladoras y las sales necesarias para mejorar u optimizar el enlace, y ensayos control adicionales se pueden incluir en el ensayo de detección de la invención.

Los compuestos encontrados para reducir el polipéptido de fusión del enlace ActRIIB-ligando por al menos aproximadamente 10% (i.e., $M_1/M_0 < 0.9$), preferiblemente mayor de aproximadamente 30%, además se puede identificar y luego, si se desea, en segundo lugar detectar la capacidad para inhibir la actividad de GDF-8 en otros ensayos, tales como el ensayo de enlace de ActRIIB, y otros ensayos basados en células e *in vivo* como se describe en los Ejemplos 5-12.

V. Métodos de Tratamiento de Enfermedades y Otros Usos

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad, son solubles y poseen propiedades farmacocinéticas que las hacen apropiadas como agentes terapéuticos, i.e., útiles para prevenir, diagnosticar, o tratar diversos trastornos médicos en animales, y especialmente, humanos. En ciertas modalidades, la vida media en circulación del polipéptido de fusión ActRIIB excede 5, 7, 10, o 14 días.

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB pueden ser utilizados para inhibir una o más actividades de GDF-8 asociados con trastornos musculares y/o de huesos. La inhibición de la actividad de GDF-8 se puede medir en ensayos de gen indicador (RGA) de pGL3(CAGA)12 como se describe en Thies *et al.* (Growth Factors (2001) 18:251-259) o como se ilustra en el Ejemplo 6.

El trastorno médico que se diagnostica, se trata, o previene por los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad, es un trastorno muscular o neuromuscular; un trastorno de tejido adiposo tal como obesidad; diabetes tipo II; tolerancia a la glucosa deteriorada; síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X); resistencia a la insulina inducida por trauma tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno; o enfermedades degenerativas óseas tales como osteoporosis.

ES 2 337 890 T3

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB en la actualidad revelados, también se pueden utilizar en terapias para reparar músculos dañados, por ejemplo, miocardio, diafragma, etc. Enfermedades y trastornos ejemplares además incluyen trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular; atrofia orgánica; fragilidad; síndrome del canal carpiano; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; y sarcopenia, caquexia y otro síndrome de atrofas musculares.

Otros trastornos médicos que se diagnostican, se tratan, o previenen por los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad son trastornos asociados con una pérdida de hueso, que incluyen osteoporosis, especialmente en las mujeres mayores y/o posmenopáusicas; osteoporosis inducida por los glucocorticoides; osteopenia; osteoartritis; y fracturas relacionadas con la osteoporosis. Otras enfermedades de hueso metabólicas y trastornos objetivo incluyen baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. Los polipéptidos de fusión de ActRIIB preferiblemente se utilizan para prevenir; diagnosticar, o tratar dichos trastornos médicos en mamíferos, especialmente, en humanos.

Las composiciones que comprenden los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento se administran en cantidades terapéuticamente efectivas. En general, una cantidad efectiva terapéuticamente puede variar con la edad, condición, y sexo del sujeto, así como la severidad de la condición médica en el sujeto. La dosificación se puede determinar por un médico y ajustar, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento. Por lo general, las composiciones se administran de manera que los polipéptidos se administran a una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 10 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 μg a 1 mg/kg , y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , o como se describe en los Ejemplos 10 y 11. Las composiciones se pueden administrar como una dosis en bolo, para maximizar los niveles en circulación por el mayor periodo de tiempo después de la dosis. La infusión continua también se puede utilizar después la dosis en bolo.

La especificación para la unidad de dosificación de los polipéptidos descritos en este documento se estipulan por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se logra, y las limitaciones inherentes en el oficio de la composición como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y eficacia terapéutica se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales *por ejemplo*, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos o terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$. Las composiciones que muestran grandes índices terapéuticos, se prefieren.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden ser utilizados en la formulación de un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

La dosis efectiva terapéuticamente, se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos de animales para lograr un rango de concentración de plasma en circulación que incluye la IC_{50} (i.e., la concentración del terapéutico que logra una inhibición media máxima de síntomas) según se determina en cultivo celular. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorear por un bioensayo apropiado. Ejemplos de bioensayos apropiados incluyen ensayos de replicación de ADN, ensayos basados en la transcripción, ensayos de enlace de GDF-8, ensayos de creatina quinasa, ensayos basándose en la diferenciación de pre-adipocitos, ensayos basados en la absorción de glucosa en adipocitos, y ensayos inmunológicos.

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento pueden ser utilizados para detectar la presencia de proteínas que pertenecen a la superfamilia TGF- β , tales como BMP-11 y GDF-8, *in vivo* o *in vitro*. Correlacionando la presencia o nivel de estas proteínas con una condición médica, alguien de habilidad en el oficio puede diagnosticar la condición médica asociada. Las condiciones médicas que se pueden diagnosticar por los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad, se establecen anteriormente.

Tales métodos de detección son bien conocidas en el oficio e incluyen ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, Western blot, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, y otras técnicas comparables. Los polipéptidos además se pueden proporcionar en un kit de diagnóstico que incorpora una o más de estas técnicas para detectar una proteína (por ejemplo, GDF-8). El citado kit puede contener otros componentes, embalaje, instrucciones, u otro material de ayuda para la detección de la proteína y uso del kit.

Cuando los polipéptidos de fusión de ActRIIB están destinados para propósitos de diagnóstico, puede ser deseable modificarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (tal como biotina) o un grupo marcador detectable (tal como un grupo fluorescente, un radioisotopo o una enzima). Si se desea, los polipéptidos de fusión de ActRIIB se pueden marcar utilizando técnicas convencionales. Apropriadas etiquetas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos, reactivos electrón-denso, enzimas, y ligandos que tienen socios de enlace específicos. Las enzimas usualmente se detectan por

su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se puede detectar por su capacidad para convertir la tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. Otros socios de enlace apropiados incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas receptor-ligando conocidas en el oficio.

5

VI. Composiciones Farmacéuticas y Métodos de Administración

Se describen aquí las composiciones apropiadas para la administración a pacientes. Las composiciones usualmente comprenden uno o más polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en este documento, la frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, cubiertas, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes de las sustancias farmacéuticamente activas, es bien conocido en el oficio. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones suplementarias, terapéuticas adicionales, o mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también se pueden incluir en un recipiente, envase, o dispensador junto con las instrucciones para su administración.

Se formula una composición farmacéutica de la invención, que es compatible con su ruta prevista de administración. Los métodos que logran la administración se conocen por aquellos de ordinaria habilidad en el oficio. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcuatánea o transdérmica. También puede ser posible obtener composiciones que se pueden administrar vía oral o tópica.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación intradérmica o subcuatánea usualmente incluyen uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos y grasas, polietileno-glicoles, glicerina, propileno glicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; soluciones reguladoras tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Tales preparaciones se pueden incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, apropiados portadores incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor™ EL (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina reguladora de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida que exista fácilmente jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propileno glicol, y polietileno glicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de estos. La apropiada fluidez se puede mantener, por ejemplo, por el uso de una cubierta tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y por el uso de agentes tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse más o menos incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimidos en forma de tabletas. Para el propósito de administración terapéutica oral, los polipéptidos de fusión de ActRIIB se pueden incorporar con excipientes y utilizar en la forma de tabletas, comprimidos medicinales, o cápsulas. Los agentes de enlace farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, comprimidos medicinales, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar; un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel™, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes™; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o sabor naranja.

Para la administración por inhalación, los polipéptidos de fusión de ActRIIB se entregan en la forma de un atomizador de aerosol de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medio transdérmico o transmucosa. Por ejemplo, en el caso de ActRIIB-Fc, las composiciones pueden ser capaces de transmisión a través de las membranas mucosas (por ejemplo, intestino, boca, o pulmones) vía la ruta mediada del receptor FcRn (U.S. Patent No. 6,030,613). La administración transmucosa se puede lograr, por ejemplo, a través del uso de pastillas para chupar, atomizadores nasales, inhaladores, o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles,

o cremas como generalmente se conoce en el oficio. Para la administración transmucosal o transdérmica, penetrantes apropiados a la barrera que se penetra se utilizan en la formulación. Tales penetrantes generalmente se conocen en el oficio, e incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico.

5 Los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de entrega microencapsulados. Los polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán aparentes para aquellos de habilidad en el oficio. Las
10 suspensiones liposomales que contienen los polipéptidos de fusión de ActRIIB revelados en la actualidad, también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos de habilidad en el oficio, por ejemplo, como se describe en U.S. Patent No. 4,522,811.

15 Puede ser ventajoso formar composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza aquí, se refiere a unidades discretas, físicamente apropiadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se trata; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el deseado efecto terapéutico en asociación con el portador farmacéutico requerido.

20 Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión de ActRIIB, tales como los ácidos nucleicos descritos anteriormente, se pueden introducir a una célula dentro del tejido, un órgano, o un organismo de manera que los polipéptidos codificados luego se pueden expresar. Esta metodología puede ser útil, por ejemplo, en la evaluación de los efectos de polipéptidos de fusión de ActRIIB sobre tejidos y órganos individuales. El ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión ActRIIB se puede unir a una secuencia de control de expresión tejido-específico, por ejemplo, secuencia promotor músculo-específico tales como el promotor de miosina o el promotor de la desmina, los elementos potenciadores de músculo específico tales como el potenciador de la creatina quinasa del músculo. Aquellos de habilidad en el oficio reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicas se pueden insertar en los vectores virales o de plásmidos, que se pueden inyectar a un mamífero sistemática, o localmente. Las células huésped también se pueden cosechar, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión ActRIIB se puede
25 transfectar en dichas células *ex vivo* para la posterior reimplantación utilizando métodos conocidos en el oficio. Los ácidos nucleicos también se pueden transfectar en un embrión de célula única para crear un animal transgénico como se describe en Gene Expression Systems, Academic Press (Fernandez *et al.* eds. 1999).

30 Los siguientes ejemplos ilustran algunas modalidades y aspectos de la invención.

35

Ejemplos

Ejemplo 1

40

Purificación de GDF-8

Los medios acondicionados a partir de una línea celular seleccionada que expresa la proteína recombinante humana de GDF-8 (GDF-8 maduro y propéptido de GDF-8) se acidificó a pH 6.5 y se aplicó a una columna de intercambio aniónico de 80 x 50 mm POROS™ HQ en tándem a una columna de intercambio catiónico de 80 x 50 mm POROS™ SP (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA). El flujo a través se ajustó a pH 5.0 y se aplicó a una columna de intercambio catiónico de 75 x 20 mm POROS™ SP (PerSeptive Biosystems) y se eluyó con un gradiente TFA/acetonitrilo. Las fracciones que contienen el complejo latente de GDF-8, según se confirmó por SDS-PAGE, se mezclaron, acidificaron con ácido trifluoroacético (TFA) a pH 2-3, luego se lleva hasta 200 ml con 0.1% de TFA para bajar la viscosidad. A
45 continuación la mezcla se aplicó a una columna C5 de 250 x 21.2 mm (Phenomenex, Torrance, CA) precedida por un guarda columna de 60 x 21.2 mm (Phenomenex) y se eluyó con un gradiente TFA/acetonitrilo, para separar el GDF-8 maduro del propéptido de GDF-8. Las fracciones mezcladas que contienen GDF-8 maduro se concentraron por liofilización para eliminar el acetonitrilo y se adicionaron 20 ml de TFA al 0.1%. A continuación la muestra se aplicó a una columna C5 de 250 x 10 mm (Phenomenex) se calentó a 60°C para ayudar en la separación. Esto se repitió hasta que
50 no se puede lograr más otra separación. Las fracciones que contienen GDF-8 maduro luego se mezclaron y se llevan hasta 40% de acetonitrilo y se aplicó a una columna de exclusión de tamaño 600 x 21.2 BioSep™ S-3000 (Phenomenex) precedida por un guarda columna de 60 x 21.2. Las fracciones que contienen el GDF-8 maduro purificado y el propéptido de GDF-8 se mezclaron por separado y se concentraron para utilizar en posteriores experimentos.

60 En SDS-PAGE, el GDF-8 maduro purificado migró como una banda amplia a 25 kDa bajo condiciones no-reductoras y 13 kDa bajo condiciones reductoras. Bajo condiciones no-reductoras y reductoras, propéptido de BMP-11 migró alrededor de 35 kDa. Un perfil similar de SDS-PAGE ha sido reportado para murino GDF-8 por McPherron *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1997) 94:12457-12461) y refleja la naturaleza dimérica de la proteína madura. El propéptido de GDF-8 migró a aproximadamente 35 kDa en SDS-PAGE reductor. El dímero BMP-11 maduro activo se purificado a partir de medio acondicionado de una línea celular que expresa BMP-11 humano recombinante de la misma
65 manera. El medio acondicionado se cargó dentro de una columna TALON™ de 10 ml (Clonetech, Palo Alto, CA). La proteína unida se eluyó con Tris 50 mM pH 8.0/NaCl 1 M/imidazol 500 mM. Las fracciones que contienen el complejo de BMP-11 se mezclaron y acidificaron con 10% de ácido trifluoroacético a un pH de 3. La mezcla del complejo

ES 2 337 890 T3

BMP-11 se aplicó a una columna C4 Jupiter de 250 x 4.6 mm (Phenomenex), la cual se calentó a 60°C para una mejor separación del BMP-11 maduro y el propéptido de BMP-11. BMP-11 se eluyó con un gradiente TFA/acetonitrilo. Las fracciones que contienen BMP-11 se concentraron por liofilización para eliminar el acetonitrilo.

5 Ejemplo 2

Características de GDF-8 Humano Recombinante Purificado

50 μg de cada GDF-8 maduro purificado y propéptido de GDF-8 purificado se mezclaron y dializaron en fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, y se sometieron a cromatografía en una columna de exclusión de tamaño BioSep™ S-3000 de 300 x 7.8 mm (Phenomenex). El peso molecular del complejo GDF-8 maduro/propéptido se determinó del tiempo de elución, utilizando estándares de peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) que se sometieron a cromatografía en la misma columna.

15 Cuando el propéptido de GDF-8 purificado se incubó con GDF-8 maduro purificado a pH neutro, las dos proteínas surgieron al complejo, como se indica por el perfil de exclusión de tamaño. El pico de proteína primaria que eluyó a 12.7 minutos tuvo un peso molecular estimado de 78 kDa a partir de estándares de peso molecular (Bio-Rad Laboratories) que se sometieron a cromatografía en la misma columna. El tamaño del complejo fue más consistente con un dímero del GDF-8 maduro asociado con dos monómeros de propéptido.

20 Para confirmar esta observación, una preparación que contiene ambos GDF-8 maduro y el propéptido de GDF-8 se incubó con o sin 1-Etil 3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato 100 mM (EDC, Pierce Chemical, Rockford, IL) por 1 hora a temperatura ambiente, se acidificaron con HCl a pH 2-3, y se concentraron con un concentrador Amicon Micron-10 (Millipore, Bedford, MA) por SDS-PAGE, utilizando un gel de acrilamida al 10% estandarizado con tricina. Las proteínas se visualizaron por tinción de azul Coomassie™ de SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Expresión de ActRIIB-Fc en Células CHO

30 Un cADN de ActRIIB humano de longitud completa se utilizó para clonar-PCR el dominio extracelular (excluyendo la secuencia que codifica el péptido señal). Los cebadores utilizados se flanquearon por los sitios SpeI (5') y NotI (3'). Después de la amplificación PCR, este fragmento PCR se clonó en los sitios SpeI/NotI del plásmido de expresión pHTop-HBML/EKFc. El marco de lectura abierto codifica: líder de la melitina de abejas de la miel (aminoácidos 1 a-21 de SEQ ID NO:3); dominio extracelular ActRIIB humano (aminoácidos 23 a 138 de SEQ ID NO:3); sitio de corte de la enteroquinasa (DDDK, SEQ ID NO:6); y fragmento Fc de IgG1 humana (aminoácidos 148 a 378 de SEQ ID NO:3). Como un resultado de la inserción del sitio SpeI, hubo una adición de Thr-22 en la secuencia.

40 Una línea celular estable CHO transfectada establemente para expresar el ActRIIB-Fc anterior se obtuvo por transfección de la lipofectina del vector pHTop-HBML que contiene la construcción ActRIIB-Fc en las células CHO/A2. Las células transfectadas se seleccionaron en metotrexato 0.1 μM . El análisis Western blot del medio acondicionado se utilizó para identificar los clones de expresión más altos.

45 El vector pHTop se derivó de pED (Kaufman *et al.* (1991) Nucleic Acids Res. 19:4485-4490) eliminando la mayoría del promotor principal tardío del adeno y la inserción de seis repeticiones del operador tet como se describe en Gossen *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551.

50 La línea celular CHO/A2 se derivó de las células CHO DUKX B11 (Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:4216-4220) por integración establemente de un activador transcripcional, una proteína de fusión entre el represor tet fusionado al dominio transcripcional VP 16 del virus herpes (Gossen *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551).

Ejemplo 4

Purificación de ActRIIB-Fc

55 El material crudo concentrado a partir del medio acondicionado se purificó por rProtein A Sephadex Fast Flow™ (XK26/4.5 cm, 23.8 ml; Pharmacia, Piscataway, NJ) a una pureza del 99%, según se determina por cromatografía de tamaño de exclusión de la siguiente manera. El medio acondicionado congelado se descongeló en un baño de agua a 37°C y se filtró a través de filtros de 0.22 μm . Cuatro partes de la solución filtrada se mezcló con una parte de la solución reguladora de carga de la Proteína A (Na_2SO_4 0.65 M, citrato de sodio 20 mM, ácido bórico 20 mM, Na_2HPO_4 20 mM, pH 9.0) y se corre sobre la columna de proteína A a temperatura ambiente. ActRIIB-Fc se eluyó completamente de la columna utilizando solución reguladora de elución de la proteína A (NaCl 0.15 M, ácido cítrico 20 mM, pH 2.5) con gradiente o elevando a un pH cercano de 4-5, y el pico se recolectó y neutralizó a pH 7.0, adicionando solución reguladora de neutralización al 25% (Na_2HPO_4 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2). Las fracciones se evaluaron por cromatografía de tamaño de exclusión y SDS-PAGE, y luego se mezclaron y almacenaron a 4°C. La proteína purificada se formuló en PBS por columna Sephadex™ G-25 desalinizada (XK50/13.4 cm, 236 ml, Pharmacia), y luego se filtró a través de un filtro de 0.22 μm y se almacenó a 4°C.

ES 2 337 890 T3

Ejemplo 5

Propiedades de enlace de GDF-8 y BMP-11 Purificado en el ensayo de enlace ActRIIB-Fc

5 El complejo latente de GDF-8 fue biotinilado en una relación de 20 moles de EZ-link™ Sulfo-NHS-Biotin (Pierce Chemical, Cat. No. 21217) por 1 mol del complejo GDF-8 por 2 horas en hielo, inactivado con 0.5% de TFA, y sometido a cromatografía en una columna C4 Jupiter de 250 x 4.6 mm (Phenomenex) para separar el GDF-8 maduro a partir del propéptido de GDF-8. Las fracciones de GDF-8 biotinilado eluidas con un gradiente TFA/acetonitrilo se mezclaron, se concentraron y cuantificaron mediante MicroBCA™ protein Assay Reagent Kit (Pierce Chemical, Cat. No. 23235).

15 BMP-11 maduro biotinilado se preparó a partir del complejo BMP-11 latente de la misma manera como se describe anteriormente. ActRIIB-Fc recombinante, se preparó como se describe en los Ejemplos 3 y 4, se recubrió en placas de ensayo de fondo plano de 96-pozos (Costar, NY, Cat. No. 3590) a 1 µg/ml en solución reguladora de carbonato de sodio 0.2 M (pH 10) durante la noche a 4°C. Las placas luego se bloquearon con 1 mg/ml de albúmina de suero de bovino y se lavaron siguiendo el protocolo estándar de ELISA. 100 µl de alícuotas de GDF-8 o BMP-11 biotinilado a diversas concentraciones se adicionaron a la placa de ELISA bloqueada, incubada por 1 hr y se lavaron. La cantidad de GDF-8 o BMP-11 unida se detectó por peroxidasa de rábano picante-Estreptavidina (SA-HRP, BD PharMingen, San Diego, CA, Cat. No.13047E) seguido por la adición de TMB (KPL, Gaithersburg, MD, Cat. No. 50-76-04). Se hicieron mediciones colorimétricas a 450 nM en un lector de microplaca Molecular Devices.

20 Como se muestra en la Figura 1, GDF-8 y BMP-11 biotinilado unido a ActRIIB-Fc, con una ED₅₀ de 15 ng/ml y 40 ng/ml, respectivamente.

25 Ejemplo 6

Actividad inhibidora de ActRIIB-Fc en Ensayo de Gen Indicador

30 Para demostrar la actividad de ActRIIB-Fc, un ensayo de gen indicador (RGA) se desarrolló utilizando una secuencia PGL3(CAGA)₁₂ del vector indicador acoplado a la luciferasa. Se reportó previamente que la secuencia CAGA era una secuencia sensible a TGF-β dentro del promotor del gen PAI-1 inducido por TGF-β (Denner *et al.* (1998) EMBO J. 17:3091-3100).

35 Un vector indicador que contiene 12 cajas CAGA, se hizo utilizando el plásmido indicador básico PGL3 (Promega, Madison, WI). La caja TATA y el sitio de iniciación de transcripción del promotor posterior principal del adenovirus (-35/+10) se insertó entre los sitios BgIII y HindIII. Los oligonucleótidos que contienen 12 repeticiones de las cajas CAGA, AGCCAGACA, se hibridaron y clonaron en el sitio XhoI. La línea celular rhabdomyosarcoma humano A204 (ATCC HTB-82) fue transfectada temporalmente con pGL3(CAGA)₁₂ utilizando el reactivo de transfección FuGENE™ 6 (Boehringer Mannheim, Germany). Después de la transfección, las células se cultivaron sobre placas de 48 pozos en medio de McCoy 5A suplementado con glutamina 2 mM, estreptomycin 100 U/ml, 1000 µg/ml de penicilina y 10% suero de fetal bovino por 16 hrs. Las células luego se trataron con o sin 10 ng/ml de GDF-8 y diversas concentraciones de ActRIIB-Fc en medio de McCoy 5A con glutamina, estreptomycin, penicilina, y 1 mg/ml de albúmina de suero de bovino por 6 hrs a 37°C. La luciferasa se cuantificó en las células tratadas utilizando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega).

45 Dos lotes de ActRIIB purificados independientemente mostraron una IC₅₀ de 0.07 a 0.1 nM en el anterior ensayo de gen indicador (Figura 2).

50 Ejemplo 7

Farmacocinética

55 La farmacocinética (PK) de ActRIIB-Fc se evaluó en ratones C57B6/SCID (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a una dosis de 1 mg/kg como una administración intravenosa única (IV) o intraperitoneal (IP). ActRIIB-Fc, producido y purificado como se describe en los Ejemplos 3 y 4, fue radiomarcado utilizando el método iodogen (Protein Pharmacokinetics and Metabolism, Plenum Press, New York, NY (Ferraiolo *et al.* eds. 1992)). Los animales recibieron una mezcla de ActRIIB-Fc sin marcar y ¹²⁵I marcado en las dosis enumeradas anteriormente y las concentraciones en suero se determinaron basándose en la radioactividad ¹²⁵I en el suero y la actividad específica de la dosis inyectada. La Figura 3 muestra la concentración en suero basándose en conteos precipitados de TCA versus el tiempo para ActRIIB-Fc administrado ya sea IV o IP. La absorción de la inyección IP se completó, y la biodisponibilidad fue cercana al 100% dentro de las primeras 180 hr después de la inyección; la distribución del volumen inicial correspondió al volumen en plasma de ratón (50 ml/kg); la concentración pico en suero fue 11 µg/ml (IP, a 6 hr después de la inyección) y 19.4 µg/ml (IV); la vida media durante la fase de eliminación terminal fue aproximadamente 5 días.

Ejemplo 8

Efecto in vivo de ActRIIB-Fc

5 Con el fin de determinar si el ActRIIB aumenta la masa muscular en ratones adultos, un estudio *in vivo* se realizó con hembras C57B6/SCID de siete-semanas de edad (The Jackson Laboratory). Los ratones se pesaron y se distribuyeron con igualdad en relación con el peso corporal en grupos de ocho. Durante un estudio de cuatro semanas, cada grupo recibió una inyección intraperitoneal semanal de los siguientes: ActRIIB-Fc (60 mg/kg, 3 mg/kg, o 60 µg/kg), anticuerpo anti-GDF-8 monoclonal de ratón JA16 (60 mg/kg), o solución reguladora de PBS (vehículo control). JA16 fue elegido debido a que este anticuerpo es específico para GDF-8, y se mostró que inhibe la actividad de regulación reductora del músculo de GDF-8 *in vivo*, en un estudio separado (U.S. Patent App. Pub. No. 20030138422). Los animales se evaluaron por ganancia en masa corporal magra, sometiéndolos a un análisis de dexta-scan antes y después del periodo de tratamiento. La masa muscular se evaluó mediante la disección y el peso de los gemelos y cuádriceps. La almohadilla grasa peri-uterina también se retiró y se pesó. Los pesos del bazo y el timo también se midieron.

Los resultados de este estudio indicaron que ActRIIB-Fc inhibió significativamente la actividad de GDF-8 *in vivo* lo que da lugar al aumento de la masa muscular. Como se preveía, los ratones administrados con JA16 mostraron pesos del músculo esquelético y corporales ligeramente más altos y tuvieron un aumento estadísticamente significativo ($p=0.05$) en pesos de los cuádriceps (Tabla 4). Los tratamientos con 60 y 3 mg/kg de ActRIIB-Fc fueron sorprendentemente mucho más efectivos en comparación con el anticuerpo JA16. Los grupos administrados con 60 mg/kg de ActRIIB-Fc y 3 mg/kg de ActRIIB-Fc tuvieron aproximadamente 3 y 2 veces de aumentos de pesos corporales respectivamente en comparación con los controles (Tabla 1). Estos aumentos primero se observaron después de una dosis. Los pesos del músculo de cuádriceps, como pesos absolutos, se incrementaron en los ratones administrados con 60 y 3 mg/kg de ActRIIB-Fc - (Tabla 3). Los músculos de gemelos, como pesos absolutos, se incrementaron en ratones administrados con 60 mg/kg de JA16 y 60 o 3 mg/kg de ActRIIB-Fc (Tabla 3). Como un porcentaje de peso corporal, pesos del músculo de cuádriceps se incrementaron en los mismos tres grupos de tratamiento en comparación con los controles (Tabla 4). También, como un porcentaje de peso corporal, los pesos de músculos de gemelos se incrementaron en los ratones tratados con 60 mg/kg de ActRIIB-Fc (Tabla 4).

TABLA 1

Pesos Corporales Terminales

	Control	JA16 60 mg/kg	ActRIIB 60 mg/kg	ActRIIB 3 mg/kg	ActRIIB 60 µg/kg
Peso Corporal (g) ± SD	20.2±1.76	20.9±1.12	25.0 ± 1.90*	22.5 ± 2.35*	20.8 ± 1.97
*= Diferencia del Grupo a $p=0.05$ en comparación con los controles					

TABLA 2

Ganancia de Peso Absoluto

	Control	JA16 60 mg/kg	ActRIIB 60 mg/kg	ActRIIB 3 mg/kg	ActRIIB 60 µg/kg
Peso Corporal (g) ± SD	1.99 ± 1.123	2.62 ± 1.007	6.23 ± 1.126*	4.28 ± 1.748*	1.24 ± 1.010
*= Diferencia del Grupo a $p=0.05$ en comparación con los controles					

ES 2 337 890 T3

TABLA 3

Pesos (g) de Órgano Absoluto

	Control	JA16 mg/kg 60	ActRIIB mg/kg 60	ActRIIB mg/kg 3	ActRIIB µg/kg 60
Bazo	0.044	0.025*	0.060	0.071	0.059
Timo	0.0342	0.178*	0.0260	0.0333	0.0344
Cuadriceps	0.151	0.171	0.232**	0.193**	0.159
Gemelos	0.111	0.123*	0.156**	0.133*	0.112
* = Diferencia del Grupo a p=0.05 en comparación con los controles					
** = Diferencia del Grupo a p=0.01 en comparación con los controles					

TABLA 4

Pesos del Órgano como Porcentaje de Peso Corporal

	Control	JA16 mg/kg 60	ActRIIB mg/kg 60	ActRIIB mg/kg 3	ActRIIB µg/kg 60
Bazo	0.214	0.119*	0.227	0.298	0.273
Timo	0.1628	0.0850*	0.0992	0.1391	0.1569
Cuadriceps	0.749	0.820*	0.926**	0.861**	0.768
Gemelos	0.548	0.590	0.621**	0.593	0.540
* = Diferencia del Grupo a p=0.05 en comparación con los controles					
** = Diferencia del Grupo a p=0.01 en comparación con los controles					

Ejemplo 9

Efecto Dosis-Dependiente de ActRIIB-Fc en la Masa Muscular

Además para investigar el efecto de ActRIIB-Fc en la masa muscular en ratones adultos, un estudio se realizó con hembras C57B6/SCID de siete-semanas de edad (The Jackson Laboratory). Los ratones se pesaron y con igualdad se distribuyeron en relación con el peso corporal en cuatro grupos de seis (6 SCID, 6 ratones C57, y dos grupos control de 6 ratones cada uno). Cada grupo recibió una inyección intraperitoneal semanal de 60 mg/kg de ActRIIB-Fc o solución reguladora de PBS (vehículo control) por una a cuatro semanas. En el día 29 del estudio, los animales se evaluaron para masa muscular por disección y el peso de los músculos gemelos y cuadriceps. Los resultados de este estudio indicaron que ActRIIB-Fc inhibió significativamente la actividad de GDF-8 *in vivo* lo que da lugar a un aumento de masa muscular incluso después una única administración de ActRIIB en comparación con el vehículo control. Los pesos del músculo de cuadriceps, como pesos absolutos, se incrementaron en ambos ratones C57 y SCID por 21% a 60% (Tabla 5). Así mismo, la masa muscular de los músculos gemelos, como pesos absolutos, se aumentó por 31 a 51% (Tabla 5).

TABLA 5

Aumento en Masa Muscular Después de Una o Más Dosis de ActRIIB-Fc

	ActRIIB 1 dosis	ActRIIB 2 dosis	ActRIIB 4 dosis
Cuadriceps (SCID)	21%	60%	44%
Gemelos (SCID)	47%	36%	31%
Cuadriceps (C57)	41%		65%
Gemelos (C57)	37%		51%

Ejemplo 10

Papel In vivo de GDF-8 en Hueso Trabecular

5 La inhibición de GDF-8 aumenta la masa muscular. Incrementa la carga mecánica, ya sea debido al aumento de la actividad muscular o aumento del peso corporal, se asocia con aumento de la masa del hueso y la densidad ósea. Por consiguiente, los ratones transgénicos (KO) GDF-8, se evaluaron para la alteración de la masa del hueso y la microarquitectura: Una evaluación inicial de ratones adultos mostró que la densidad ósea en la espina dorsal de los ratones KO fue casi dos-veces más alta que la de sus compañeros de camada de tipo salvaje. Este aumento superó con creces lo que podría haberse esperado que fuera solamente debido al aumento de masa muscular en los ratones KO GDF-8.

15 Imágenes microtomográficas de alta resolución (μ CT40, Scanco Medical, Switzerland) se utilizaron para evaluar la fracción y microarquitectura del volumen del hueso trabecular en la 5ª vertebral lumbar y distal femoral y geometría del hueso cortical en la diáfisis femoral media de ratones adultos KO y de tipo salvaje (WT) GDF-8. Las muestras se tomaron de KO GDF-8 de 9-10 meses de edad y controles de la misma camada (cuatro ratones de cada genotipo y sexo). El cuerpo vertebral total y fémur se escanearon utilizando tomografía microcomputarizada a una resolución de $12\ \mu\text{m}$. Las regiones de interés que abarcan el hueso trabecular del cuerpo vertebral o el hueso trabecular de la metáfisis distal femoral (i.e., esponjosa secundaria) se identificaron utilizando un algoritmo de contorno, semi-automatizado. Los siguientes parámetros se calcularon utilizando evaluaciones de 3D directas: fracción de volumen del hueso (%), espesor trabecular (μm), separación (μm) y número (1/mm). Además, la densidad de conectividad, un indicador de que tan bien la red trabecular se conecta, se evaluó, así como los parámetros del hueso cortical en la región diafisaria media en el fémur, incluyendo zona total, zona del hueso, y espesor cortical.

25 Ambos ratones KO machos y hembras han aumentado dramáticamente la densidad ósea trabecular en el cuerpo vertebral en comparación con los compañeros de camada WT (n=4, +93% y +70%, respectivamente, $p < 0.0001$). Este aumento de densidad ósea trabecular se acompañó por un aumento del 14% en el espesor trabecular ($p = 0.03$), un aumento del 38% en número trabecular ($p = 0.0002$), y una disminución del 10% en separación trabecular ($p = 0.009$). El efecto combinado de estos cambios en arquitectura y densidad dio lugar a un aumento de 3.4- y 1.7-veces en conectividad en machos y hembras KO, respectivamente, en comparación con los de sus compañeros de camada WT ($p < 0.0001$). Además, una medida desigual del nivel de mineralización del hueso trabecular indicó que el contenido mineral promedio de las trabeculas fue el 8% superior en los ratones KO relativos a los controles ($p < 0.0001$). Existe un indicio de que el efecto es mayor en ratones machos que en ratones hembras, pero el tamaño de muestra es muy pequeño para hacer conclusiones definitivas. Las características del hueso trabecular vertebral evaluadas mediante la tomografía microcomputarizada de alta-resolución se muestran en la Tabla 6.

40 En contraste con las observaciones en la espina dorsal, los ratones KO machos y hembras tuvieron densidad ósea trabecular más pequeña en el fémur distal que los compañeros de camada WT (n=4, $p = 0.05$ para el efecto del fenotipo completo) (Tabla 7). Este decremento en densidad ósea fue más pronunciado en los ratones hembras KO, que en los ratones machos KO. Los ratones GDF-8 KO tuvieron un espesor trabecular similar como sus compañeros de camada WT, pero tuvieron más pocas trabeculas y aumento de la separación trabecular en comparación con los controles de la misma camada. Sin embargo, aunque el espesor cortical en la columna media femoral fue similar en machos GDF-8 KO y sus controles de la misma camada, fue aproximadamente 10% mayor en los ratones hembras GDF-8 KO que en sus compañeros de camada WT (n=4, $p = 0.04$) (ver Tabla 8). No hubo diferencias en la zona cortical del hueso o fracción de la zona del hueso entre los dos genotipos.

TABLA 6

Características del Hueso Trabecular Vertebral (Promedio \pm SEM)

	Macho WT	Macho KO	Hembra WT	Hembra KO
55 Fracción volumen óseo (%)	23.3 \pm 4.7	45.0 \pm 5.5	27.5 \pm 5.5	46.9 \pm 10.8
Espesor trabecular (μm)	52 \pm 3	58 \pm 6	52 \pm 5	61 \pm 8
Separación Trabecular (μm)	210 \pm 21	145 \pm 8	183 \pm 21	169 \pm 41
Número Trabecular (1/mm)	4.6 \pm 0.4	7.0 \pm 0.4	5.2 \pm 0.4	6.6 \pm 1.3
60 Densidad conectividad (1/mm³)	137 \pm 15	470 \pm 114	198 \pm 29	339 \pm 81
Grado de anisotropía	1.68 \pm 0.08	1.29 \pm 0.02	1.54 \pm 0.12	1.34 \pm 0.03

65

ES 2 337 890 T3

TABLA 7

Características del Hueso Trabecular en Metafisis Femoral Distal (Promedio \pm SEM)

	Macho WT	Macho KO	Hembra WT	Hembra KO
Fracción volumen óseo (%)	5.1 \pm 1.8	2.9 \pm 1.7	11.9 \pm 7.0	54 \pm 3.1
Espesor trabecular (μm)	68 \pm 1.2	68 \pm 2.7	73 \pm 7	63 \pm 9
Separación trabecular (μm)	353 \pm 16	472 \pm 90	296 \pm 73	464 \pm 98
Número trabecular (1/mm)	2.84 \pm 0.12	2.24 \pm 0.51	3.46 \pm 0.69	2.26 \pm 0.57
Densidad conectividad (1/mm³)	5.9 \pm 3.7	4.0 \pm 6.9	31.5 \pm 25.2	15.4 \pm 15.1

TABLA 8

Características del Hueso Cortical en la Diafisis-Media Femoral (Promedio \pm SEM)

	Macho WT	Macho KO	Hembra WT	Hembra KO
Área de Hueso (mm²)	5.1 \pm 1.8	2.9 \pm 1.7	11.9 \pm 7.0	5.4 \pm 3.1
Espesor Cortical (μm)	68 \pm 1.2	68 \pm 2.7	73 \pm 7	63 \pm 9
Área del Hueso/Área Total (%)	353 \pm 16	472 \pm 90	296 \pm 73	464 \pm 98

Ejemplo 11

Tratamiento de Desórdenes degenerativos del hueso y del músculo

Los inhibidores de GDF-8 tales como, por ejemplo, polipéptidos de fusión de ActRIIB son útiles para los tratamientos dirigidos al aumento de masa muscular, y también para la prevención y el tratamiento de osteoporosis. Además, la inhibición de GDF-8 puede ser útil en otros casos donde un efecto anabólico en el hueso se desea, tales como el aumento de curación del hueso (i.e., reparación de fracturas, fusión de la espina dorsal, etc.). Los polipéptidos de fusión de ActRIIB descritos en este documento se utilizan para tratar un sujeto en el inicio de la enfermedad o que tienen una enfermedad degenerativa ósea o muscular establecida.

La eficacia de ActRIIB-Fc para el tratamiento de trastornos óseos, por ejemplo, osteoporosis, se confirma utilizando modelos bien establecidos de osteoporosis. Por ejemplo, han sido utilizados ratones ovariectomizados para probar la eficacia de nuevo tratamiento con fármacos para la osteoporosis (Alexander *et al.* (2001) *J. Bone Min. Res.* 16:1665-1673; and Anderson *et al.* (2001) *J. Endocrinol.* 170:529-537). Similares a los humanos, estos roedores muestran una rápida pérdida de hueso de la cavidad de la ovariectomía, especialmente en hueso esponjoso. Las evaluaciones finales se basan en la densidad mineral del hueso, marcadores bioquímicos de volumen del hueso en suero y orina, fuerza del hueso, e histología/histomorfometría.

En un estudio, ratones hembras normales y/o inmunes comprometidos se someten a ovariectomía a las 12-16 semanas de edad y permitido que pierdan hueso por cuatro a seis semanas. Después de este periodo de pérdida de hueso, el tratamiento con ActRIIB-Fc (inyección IP) o vehículo se lleva a cabo por uno a seis meses. El protocolo del tratamiento puede variar, con las pruebas de diferentes dosis y regímenes de tratamiento (*por ejemplo*, inyecciones diarias, semanales, o bi-semanales). Se prevé que los ratones ovariectomizados (o ratas) sin tratar, deberían perder aproximadamente 10-30% de densidad ósea relativa a los intactos (i.e., no-ovariectomizados), ratones correspondientes en edad. Se prevé que los ratones tratados con ActRIIB-Fc tendrían 10 a 50% más de masa del hueso y densidad ósea que aquellos ratones que reciben el tratamiento con vehículo, y adicionalmente que este aumento en densidad ósea sería asociado con el aumento de fuerza del hueso, particularmente en regiones con una proporción mayor de hueso esponjoso en comparación con el hueso cortical.

El objetivo de otro estudio es demostrar que ActRIIB-Fc es efectivo en la prevención de la disminución de la masa del hueso, microarquitectura y fuerza asociada con la deficiencia del estrógeno. Por lo tanto, el estudio tiene un diseño similar a los descritos anteriormente, excepto que el tratamiento con anticuerpos de ActRIIB-Fc se inició inmediatamente después de la ovariectomía, en lugar de después del periodo de pérdida de hueso. Se prevé que los ratones tratados con ActRIIB-Fc deberían perder significativamente menos masa del hueso después de la ovariectomía que los ratones tratados con el vehículo.

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB también se utilizan para prevenir y/o para reducir la severidad y/o los síntomas de la enfermedad. Se prevé que los polipéptidos de fusión de ActRIIB serían administrados como una inyección subcutánea con tanta frecuencia como una vez por día y con tan poca frecuencia como una vez al mes. La duración del tratamiento podría oscilar entre un mes y varios años.

ES 2 337 890 T3

Para probar la eficacia clínica de ActRIIB-Fc en humanos, mujeres postmenopáusicas con baja masa ósea se identificaron mediante la prueba de densidad ósea y se asignaron al azar en un grupo de tratamiento. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo de placebo y uno a tres grupos que recibieron el anticuerpo (diferentes dosis). Los individuos se siguieron prospectivamente por uno a tres años para evaluar cambios en los marcadores bioquímicos de volumen óseo, cambios en la densidad mineral del hueso, y la ocurrencia de fracturas por fragilidad. Se prevé que los individuos que reciben tratamiento deberían mostrar un aumento en la densidad mineral del hueso en el fémur proximal y la espina dorsal lumbar de 2-30% respecto al valor basal, y habría una menor incidencia de fracturas por fragilidad. Se prevé que los marcadores bioquímicos de formación de hueso aumentarían.

Los polipéptidos se administran como el compuesto activo solo o en combinación con otro compuesto o composición. Cuando se administra como el compuesto activo solo o en combinación con otro compuesto o composición, la dosificación es preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg y 20 mg/kg, dependiendo de la severidad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. La dosis efectiva apropiada se selecciona por el médico tratante a partir de los siguientes rangos: 1 µg/kg a 20 mg/kg, 1 µg/kg a 10 mg/kg, 1 µg/kg a 1 mg/kg, 10 µg/kg a 1 mg/kg, 10 µg/kg a 100 µg/kg, 100 µg a 1 mg/kg, y 500 µg/kg a 1 mg/kg. Los regímenes de tratamiento ejemplares y los resultados se resumen en la Tabla 9. Los regímenes alternativos incluyen: (1) 1 x IC₅₀, o 40 µg/kg dosis inicial y 0.5 x IC₅₀, o 20 µg/kg, 2 semanas más tarde; (2) 10 x IC₅₀ dosis inicial y 5 x IC₅₀ 2 semanas más tarde, o 100 x IC₅₀ y 50 x IC₅₀ 2 semanas después.

TABLA 9

Ejemplos de Casos Clínicos

Paciente No.	Estado previo al tratamiento	Régimen de Tratamiento	Resultado
Paciente 1	Sin signos clínicos, posmenopausia y/o sobre 60 años de edad	0.01-1 mg/kg bi-semanal por 4-24 semanas	Mantenimiento y/o aumento de la masa muscular/ del hueso
Paciente 2	Signos clínicos suaves, pérdida de masa muscular y/o pérdida de hueso	0.01-20 mg/kg semanal por 4 semanas más	Mantenimiento y/o aumento de masa muscular/del hueso
Paciente 3	Estado avanzado de osteoporosis	0.01-20 mg/kg dos veces semanales por 6 o más semanas	Mejora de signos clínicos, mantenimiento y/o aumento de masa muscular/del hueso
Paciente 4	Severa pérdida de masa muscular y hueso	0.01-20 mg/kg diaria por 6 o más semanas	Mejora de signos clínicos, reducción en la severidad de los síntomas y/o aumento de masa muscular/del hueso

Ejemplo 12

Tratamiento de Desórdenes Metabólicos

Los inhibidores de GDF-8, tales como, por ejemplo, polipéptidos de fusión de ActRIIB, son útiles para el tratamiento de trastornos metabólicos tales como diabetes tipo II, tolerancia a la glucosa deteriorada, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por trauma (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad). Los anticuerpos de los polipéptidos de fusión de ActRIIB se pueden utilizar para tratar un sujeto en el inicio de la enfermedad o que tiene una enfermedad metabólica establecida.

La eficacia de los polipéptidos de fusión de ActRIIB para el tratamiento de trastornos metabólicos, por ejemplo, diabetes tipo II y/o obesidad, se confirma utilizando modelos murino de obesidad bien establecidos, resistencia a la insulina y diabetes tipo II, incluyendo ob/ob, db/db, y cepas que llevan la mutación de color amarillo letal. La resistencia a la insulina también puede ser inducida por alimentación de grasa alta o calórica alta de ciertas cepas de ratones, incluyendo C57BL/6J. De manera similar a los humanos, estos roedores desarrollan resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia, y deterioro de la homeostasis de glucosa lo que da lugar a la hiperglicemia. Las evaluaciones de los resultados se basan en mediciones en suero de glucosa, insulina y lípidos. Las mediciones de sensibilidad a la insulina mejorada se pueden determinar por pruebas de tolerancia a la insulina y pruebas de tolerancia a la glucosa. Técnicas más sensibles incluirían el uso de pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico para evaluar las mejoras es

ES 2 337 890 T3

el control glicémico y la sensibilidad a la glicemia. Además, las técnicas de pinzamiento permitirían una evaluación cuantitativa del papel principal de los tejidos que disponen de la glucosa (músculo, tejido adiposo, y el hígado) en control glicémico mejorado.

5 En un estudio, el tratamiento con un polipéptido de fusión ActRIIB tal como se presenta en la SEQ ID NO:3 (inyección IP) o vehículo se lleva a cabo por una semana a seis meses. El protocolo de tratamiento podría variar, con la prueba de diferentes dosis y regímenes de tratamiento (por ejemplo, inyecciones diarias, semanales, o bi-semanales). Se prevé que los ratones tratados con el polipéptido de fusión tendrían mayor absorción de glucosa, aumento de la glucólisis y síntesis del glucógeno, ácidos grasos libres inferiores y triglicéridos en el suero en comparación con
10 ratones que reciben tratamiento con placebo.

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB también se utilizan para prevenir y/o para reducir la severidad y/o los síntomas de la enfermedad. Se prevé que los polipéptidos de fusión de ActRIIB serían administrados como una inyección subcutánea tan frecuentemente como una vez por día y tan poco frecuente como una vez por mes. La duración del
15 tratamiento podría oscilar entre un mes y varios años.

Para probar la eficacia clínica de los polipéptidos de fusión de ActRIIB en humanos, sujetos que padecen de o en riesgo de diabetes tipo II se identificaron y se asignaron al azar a un grupo de tratamiento. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo de placebo y uno a tres grupos que reciben los polipéptidos de fusión de ActRIIB (dosis diferentes).
20 Los individuos se siguieron prospectivamente por un mes a tres años para evaluar los cambios en el metabolismo de la glucosa. Se prevé que los individuos que reciben tratamiento deberían mostrar una mejora.

Los polipéptidos de fusión de ActRIIB se administran como el compuesto activo solo o en combinación con otro compuesto o composición. Cuando se administra como el compuesto activo solo o en combinación con otro compuesto
25 o composición, la dosificación puede ser de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg , dependiendo de la severidad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. La dosis efectiva apropiada se selecciona por el médico tratante a partir de los siguientes rangos: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 10 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 μg a 1 mg/kg , y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg . Los regímenes de tratamiento ejemplares y resultados se resumen en la Tabla 7.

30

TABLA 7

Ejemplos de Casos Clínicos

35

Paciente No.	Estado previo al tratamiento	Régimen del Tratamiento	Resultado
40 Paciente 1	Sin signos clínicos, historia familiar de diabetes tipo II	0.01-1 mg/kg cada 4 semanas por 48 semanas	Prevención de diabetes tipo II
45 Paciente 2	Signos clínicos suaves de síndrome X	0.01-20 mg/kg semanal por 4 más semanas	Mejora de la tolerancia a la insulina y metabolismo de la glucosa, y presión sanguínea baja
50 Paciente 3	Estado avanzado de diabetes tipo 2	0.01-20 mg/kg dos veces a la semana por 6 o más semanas	Mejora de los signos clínicos, reducción en la severidad de los síntomas y/o aumento en relación masa muscular/grasa corporal
55 Paciente 4	Severa resistencia a la insulina y/o obesidad	0.01-20 mg/kg diaria por 6 o más semanas	Mejora de los signos clínicos, reducción en la severidad de los síntomas y/o disminución en grasa corporal

60

65

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citadas en la descripción

- 10 • US 5885794 A [0004]
- WO 0043781 A [0005]
- WO 0210214 A [0009]
- 15 • US 5624821 A [0056]
- US 5648260 A [0056]
- 20 • US 4640835 A [0060]
- US 4496689 A [0060]
- US 4301144 A [0060]
- 25 • US 4670417 A [0060]
- US 4791192 A [0060]
- 30 • US 4179337 A [0060]
- US 4766106 A [0060]
- US 4495285 A [0060]
- 35 • US 4609546 A [0060]
- WO 8705330 A [0061]
- 40 • US 6030613 A [0094]
- US 4522811 A [0095]
- US 20030138422 A [0116]
- 45

Literatura no-patente citada en la descripción

- 50 • **Kingsley et al.** *Genes Dev.*, 1994, vol. 8, 133-146 [0002] [0036]
- **Hoodless et al.** *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, vol. 228, 235-272 [0002]
- **Gamer et al.** *Dev. Biol.*, 1999, vol. 208, 222-232, <http://www.ronmyrick.com> [0002]
- 55 • **Nakashima et al.** *Mech. Dev.*, 1999, vol. 80, 185-189 [0002] [0036]
- **Massague.** *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, vol. 1, 16-178 [0003]
- 60 • **Moustakas et al.** *J. Cell Sci.*, 2001, vol. 114, 4359-4369 [0003]
- **Attisano et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, 1066-1073 [0004]
- **McPherron et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 83-90 [0005]
- 65 • **Hamrick et al.** *Bone*, 2000, vol. 27 (3), 343-349 [0005]
- **Ashmore et al.** *Growth*, 1974, vol. 38, 501-507 [0005]

ES 2 337 890 T3

- **Swatland** *et al. J. Anim. Sci.*, 1994, vol. 38, 752-757 [0005]
- **McPherron** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, vol. 94, 12457-12461 [0005] [0037] [0100]
- 5 • **Kambadur** *et al. Genome Res.*, 1997, vol. 7, 910-915 [0005]
- **Gonzalez-Cadavid** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, vol. 95, 14938-14943 [0005]
- 10 • **Kim** *et al. BBRC*, 2001, vol. 281, 902-906 [0005]
- **Hoodless** *et al. Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 1998, vol. 228, 235-72 [0036]
- **Gamer** *et al. Dev. Biol.*, 1999, vol. 208, 222-232 [0036]
- 15 • **Altschul** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0043]
- Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.*, 1995 [0044]
- **Church** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984, vol. 81, 1991-1995 [0044]
- 20 • **Altschul** *et al. J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0051]
- **Needleman** *et al. J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 444-453 [0051]
- 25 • **Meyers** *et al. Comput. Appl. Biosci.*, 1988, vol. 4, 11-17 [0051]
- **Lund** *et al. J. Immun.*, 1991, vol. 147, 2657-2662 [0056]
- **Morgan** *et al. Immunology*, 1995, vol. 86, 319-324 [0056]
- 30 • **Angal** *et al. Mol. Immunol.*, 1993, vol. 30, 105-108 [0056]
- **Aplin** *et al. Crit. Rev. Biochem.*, 1981, vol. 22, 259-306 [0061]
- 35 • **Hakimuddin** *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0061]
- **Edge** *et al. Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0061]
- **Thotakura** *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0061]
- 40 • Gene Expression Systems. *Academic Press*, 1999 [0069] [0097]
- **Sambrook** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0070]
- 45 • Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1992 [0070]
- **Thies** *et al. Growth Factors*, 2001, vol. 18, 251-259 [0076]
- **Kaufman** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4485-4490 [0106]
- 50 • **Gossen** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, vol. 89, 5547-5551 [0106] [0107]
- **Urlaub** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0107]
- 55 • **Denner** *et al. EMBO J.*, 1998, vol. 17, 3091-3100 [0112]
- Protein Pharmacokinetics and Metabolism. *Plenum Press*, 1992 [0115]
- **Alexander** *et al. J. Bone Min. Res.*, 2001, vol. 16, 1665-1673 [0124]
- 60 • **Anderson** *et al. J. Endocrinol.*, 2001, vol. 170, 529-537 [0124]
- 65

ES 2 337 890 T3

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido de fusión del receptor de Activina tipo IIB (ActRIIB) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno degenerativo óseo en un mamífero, en donde el polipéptido de fusión ActRIIB comprende (a) una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a los aminoácidos 23 a 138 de la SEQ ID NO:3 y es capaz de unirse a un factor-8 de crecimiento y de diferenciación (GDF-8) y (b) la región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgE, o IgM.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde el mamífero es humano.
3. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento es para ser administrado a un mamífero con necesidad del tratamiento o prevención de un trastorno seleccionado de al menos uno de osteoartritis y osteoporosis.
4. El uso de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido de fusión ActRIIB es para ser administrado en la cantidad efectiva seleccionada de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 10 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 μg a 1 mg/kg , y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg .
5. El uso de la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de fusión ActRIIB comprende los aminoácidos 23 a 138 de la SEQ ID NO:3.
6. El uso de la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de fusión ActRIIB comprende los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO:1.
7. El uso de la reivindicación 1, en donde la segunda secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de fusión ActRIIB comprende una secuencia seleccionada de (a) el fragmento Fc de IgG, (b) el fragmento Fc de IgG1, (c) el fragmento Fc de IgG4, y (d) los aminoácidos 148 a 378 de la SEQ ID NO:3.
8. El uso de la reivindicación 1, en donde la secuencia del polipéptido de fusión ActRIIB se define en SEQ ID NO:3.
9. El uso de la reivindicación 1, en donde la vida media en circulación del polipéptido de fusión ActRIIB excede 5 días.
10. El uso de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión se codifica por un ácido nucleico que hibridiza a la secuencia de SEQ ID NO:4 bajo condiciones estrictas de hibridación, y en donde el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que es capaz de unirse a GDF-8.
11. Una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
12. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 11.
13. El ácido nucleico de la reivindicación 12, en donde dicho ácido nucleico se define en SEQ ID NO:4.
14. Un vector de expresión, que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.
15. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 14.
16. Un método para identificar los inhibidores de GDF 8, que comprende:
 - (a) la preparación de una primera mezcla de enlace que comprende el polipéptido de fusión ActRIIB de la reivindicación 11 y GDF 8;
 - (b) la medición de la cantidad de enlace entre el polipéptido de fusión ActRIIB y GDF 8 en la primera mezcla;
 - (c) la preparación de una segunda mezcla de enlace que comprende el polipéptido de fusión ActRIIB, GDF 8 y un compuesto de prueba;y
 - (d) la medición de la cantidad de enlace entre el polipéptido de fusión ActRIIB y GDF 8 en la segunda mezcla.
17. Uso de un polipéptido de fusión ActRIIB en la fabricación de un medicamento para aumentar la densidad ósea trabecular, en donde el polipéptido de fusión ActRIIB comprende (a) una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a los aminoácidos 23 a 138 de la SEQ ID NO:3 y es capaz de unirse al factor-8 de crecimiento y de diferenciación (GDF-8) y (b) la región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgE, o IgM.

ES 2 337 890 T3

18. El uso de la reivindicación 17, en donde el polipéptido de fusión ActRIIB es para ser administrado al mamífero en una dosis efectiva de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 10 mg/kg , 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 μg a 1 mg/kg , o 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg .
- 5 19. El uso de la reivindicación 17, en donde la primera secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión ActRIIB comprende los aminoácidos 23 a 138 de SEQ ID NO:3.
20. El uso de la reivindicación 17, en donde la primera secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión ActRIIB comprende los aminoácidos 19 a 134 de SEQ ID NO:1.
- 10 21. El uso de la reivindicación 17, en donde la segunda secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión ActRIIB comprende (a) el fragmento Fc de IgG, (b) el fragmento Fc de IgG1, (c) el fragmento Fc de IgG4, o (d) aminoácidos 148 a 378 de SEQ ID NO:3.
- 15 22. El uso de la reivindicación 17, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión ActRIIB (a) se presenta en la SEQ ID NO:3 o (b) se codifica por un ácido nucleico que hibridiza a la secuencia de SEQ ID NO:4 bajo condiciones estrictas de hibridación, en donde el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que es capaz de unirse a GDF-8.
- 20 23. El uso de la reivindicación 17, en donde la vida media en circulación del polipéptido de fusión ActRIIB excede 5 días.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

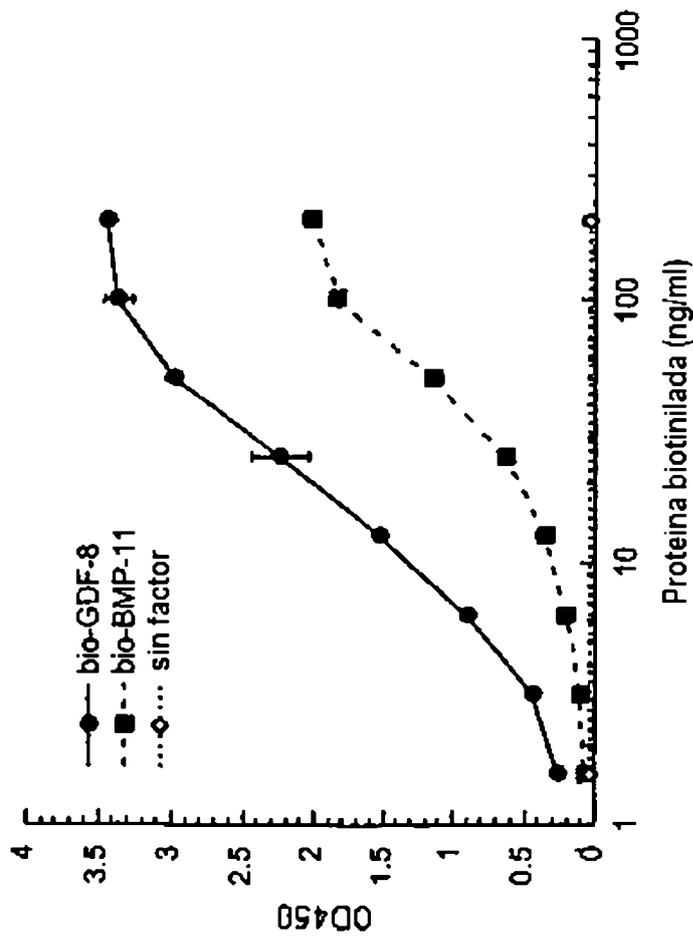


Fig. 1

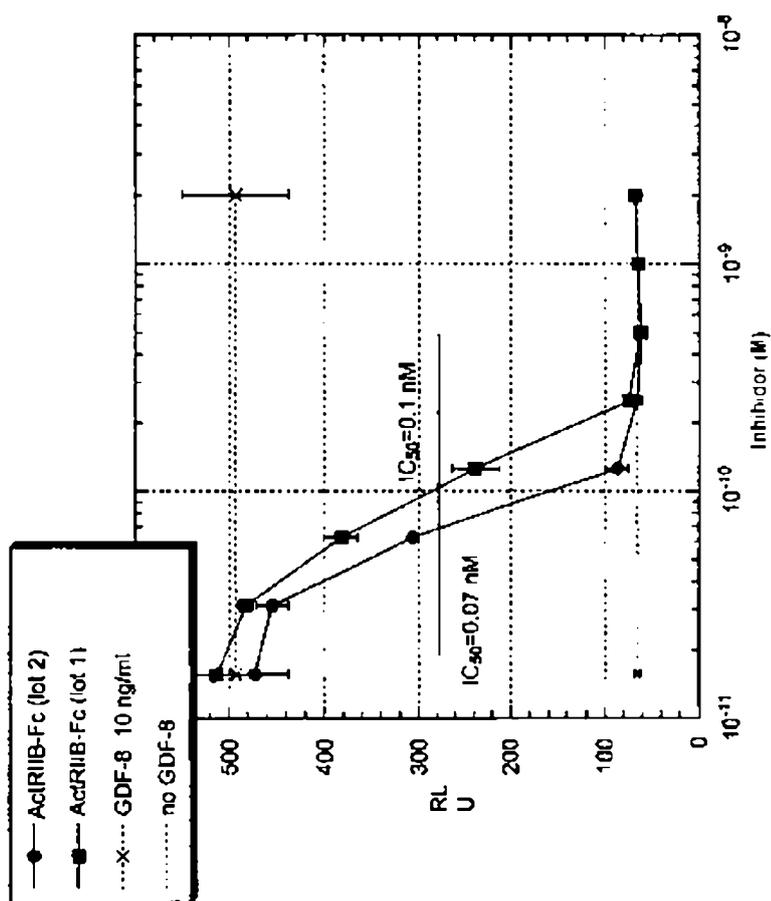


Fig. 2

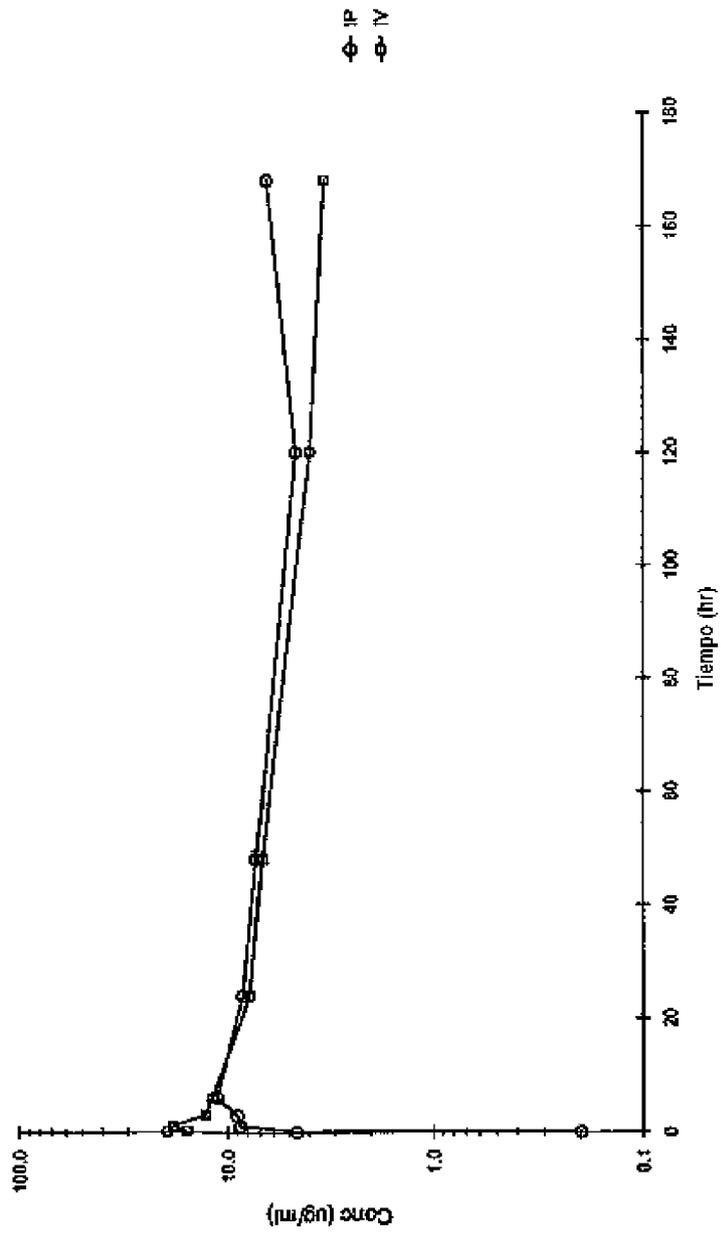


Fig. 3

ES 2 337 890 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Wyeth
Wolfman, Neil
5 Bouxsein, Mary

<120> Polipéptidos de Fusión de ActRIIB y Uses Therefor

<130> 8702.093-304

<160> 6

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 512

15 <212> PRT

<213> Humano

<400> 1

20

Met	Thr	Ala	Pro	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Ser	Leu	Cys
1				5					10					15	

25

Ala	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr
			20					25					30		

30

Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg
		35					40					45			

35

Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala
	50					55					60				

40

Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp
65					70					75					80

45

Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn
				85					90					95	

50

55

60

65

ES 2 337 890 T3

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 5 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 10 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 15 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160
 20 Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175
 25 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190
 30 Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205
 35 Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220
 40 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240
 45 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255
 50 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270
 55 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285
 60 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300
 65 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320
 70 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335
 75 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

ES 2 337 890 T3

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

5 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380

10 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400

15 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415

20 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430

25 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445

30 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460

35 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480

40 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

45 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 2
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 2

50 Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15

55 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30

60 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr

65

ES 2 337 890 T3

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

ES 2 337 890 T3

Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300

5

Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320

10

Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335

15

Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350

20

Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365

25

Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

<210> 3
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> Quimera

30

<400> 3

35

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

40

Ser Tyr Ile Tyr Ala Thr Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu
 20 25 30

45

Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser
 35 40 45

50

Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr
 50 55 60

55

Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly
 65 70 75 80

60

Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala
 85 90 95

65

Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe
 100 105 110

ES 2 337 890 T3

Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val
 115 120 125
 5
 Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Arg Gly Asp Asp
 130 135 140
 10
 Asp Asp Lys Thr Arg Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 145 150 155 160
 15
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 165 170 175
 20
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 180 185 190
 25
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 195 200 205
 30
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 210 215 220
 35
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240
 40
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 245 250 255
 45
 Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 260 265 270
 50
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 275 280 285
 55
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 290 295 300
 60
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 305 310 315 320
 65
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 325 330 335
 70
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 340 345 350
 75
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 355 360 365
 80
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Pro Lys
 370 375

ES 2 337 890 T3

<210> 4

<211> 1134

<212> ADN

5 <213> Quimera

<400> 4

```
10      atgaaattct tagtcaacgt tgcccttggt tttatggctg tgtacatttc ttacatctat      60
      gcgactagtg ggcgtgggga ggctgagaca cgggagtgca tctactacaa cgccaactgg      120
      gagctggagc gcaccaacca gagcggcctg gagcgtgctg aaggcgagca ggacaagcgg      180
15      ctgcactgct acgcctcctg gcgcaacage tctggacca tcgagctcgt gaagaagggc      240
      tgctggctag atgaattcaa ctgctacgat aggcaggagt gtgtggccac tgaggagAAC      300
      cccaggtgtg acttctgctg ctgtgaaggc aacttctgca acgagcgtt cactcatttg      360
20      ccagaggctg ggggcccgga agtcaegtac gagccacccc cgacagcccc caccggcggc      420
      cgcgagagcg acgacgacaa gacgcgttct agagacaaaa ctcacacatg cccaacctgc      480
      ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac      540
25      accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgctggt tgggtggact gagccacgaa      600
      gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      660
30      aagccgcggg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      720
      caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca      780
      gtccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      840
35      accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900
      aaaggttctt atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC      960
      aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag      1020
40      ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaagtct tctcatgctc cgtgatgcat      1080
      gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtccccgcc taaa      1134
```

45 <210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 5

Gly Ser Gly Ser

1

55

<210> 6

<211> 4

60 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 6

65 **Asp Asp Asp Lys**

1

ES 2 337 890 T3

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160

5

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

10

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

15

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

20

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

25

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

30

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

35

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

40

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

45

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

50

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

55

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

60

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

65

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

ES 2 337 890 T3

	Val	Leu	Glu	Gly	Ala	Ile	Asn	Phe	Gln	Arg	Asp	Ala	Phe	Leu	Arg	Ile
		370					375					380				
5	Asp	Met	Tyr	Ala	Met	Gly	Leu	Val	Leu	Trp	Glu	Leu	Val	Ser	Arg	Cys
	385					390					395					400
10	Lys	Ala	Ala	Asp	Gly	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Met	Leu	Pro	Phe	Glu	Glu
					405					410					415	
15	Glu	Ile	Gly	Gln	His	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu	Val	Val	Val
				420					425					430		
20	His	Lys	Lys	Met	Arg	Pro	Thr	Ile	Lys	Asp	His	Trp	Leu	Lys	His	Pro
			435					440					445			
25	Gly	Leu	Ala	Gln	Leu	Cys	Val	Thr	Ile	Glu	Glu	Cys	Trp	Asp	His	Asp
		450					455						460			
30	Ala	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Ala	Gly	Cys	Val	Glu	Glu	Arg	Val	Ser	Leu
	465					470					475					480
35	Ile	Arg	Arg	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Ser	Leu
					485					490					495	
40	Val	Thr	Ser	Val	Thr	Asn	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Ile
				500					505					510		
45	<210> 2															
	<211> 375															
	<212> PRT															
50	<213> Humano															
	<400> 2															
55	Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Leu	Cys	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Ile
	1				5					10					15	
60	Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn
				20					25					30		
65	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr
			35					40					45			

ES 2 337 890 T3

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

ES 2 337 890 T3

	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
			275					280					285			
5	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
		290					295					300				
10	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys
	305					310					315				320	
15	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
				325						330					335	
20	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr
			340						345					350		
25	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val
			355					360					365			
30	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser									
		370					375									
35	<210> 3															
40	<211> 378															
	<212> PRT															
	<213> Quimera															
45	<400> 3															
50	Met	Lys	Phe	Leu	Val	Asn	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Met	Val	Val	Tyr	Ile
	1				5					10					15	
55	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu
				20					25					30		
60	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser
			35					40					45			
65	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr
		50					55				60					
70	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly
	65					70					75					80
75	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala

ES 2 337 890 T3

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

ES 2 337 890 T3

<400> 5

Gly Ser Gly Ser
1

5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 6

15 Asp Asp Asp Lys
1

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65