

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 741 477**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2012 PCT/US2012/060650**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059347**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012 E 12842601 (2)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2797620**

(54) Título: **Composiciones para tratar la sobrecarga de hierro en talasemia**

(30) Prioridad:

17.10.2011 US 201161547932 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

(73) Titular/es:

ACCELERON PHARMA INC. (100.0%)
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US

(72) Inventor/es:

SEEHRA, JASBIR;
PEARSALL, ROBERT SCOTT;
KUMAR, RAVINDRA y
SURAGANI, NAGA VENKATA SAI RAJASEKHAR

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 741 477 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

Composiciones para tratar la sobrecarga de hierro en talasemia

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense con el n.º de serie 61/547.932, depositada el lunes, 17 de octubre de 2011.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El glóbulo rojo o eritrocito maduro es responsable del transporte de oxígeno en los sistemas circulatorios de los vertebrados. Los glóbulos rojos contienen altas concentraciones de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión parcial de oxígeno (pO_2) relativamente alta y suministra oxígeno a áreas del cuerpo 15 con una pO_2 relativamente baja.

Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un procedimiento denominado eritropoyesis. La eritropoyesis postnatal se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas vías de señalización controla el equilibrio de la proliferación celular, la 20 diferenciación, la supervivencia y la muerte. En condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a una tasa que mantiene una masa constante de glóbulos rojos en el cuerpo, y la producción puede aumentar o disminuir en respuesta a diversos estímulos, incluida la mayor o menor tensión de oxígeno o la demanda de tejidos. El procedimiento de eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras comprometidas con el linaje y se desarrolla a través de una serie de distintos tipos de células precursoras. Las etapas finales de la eritropoyesis se producen cuando los 25 reticulocitos se liberan en el torrente sanguíneo y pierden sus mitocondrias y ribosomas al asumir la morfología del glóbulo rojo maduro. Un nivel elevado de reticulocitos, o una relación elevada de reticulocito:eritrocito, en la sangre es indicativo de un aumento en las tasas de producción de glóbulos rojos.

La eritropoyetina (EPO) es ampliamente reconocida como el regulador positivo más significativo de la eritropoyesis 30 postnatal en vertebrados. La EPO regula la respuesta eritropoyética compensatoria a la tensión reducida de oxígeno en los tejidos (hipoxia) y los niveles bajos de glóbulos rojos o los niveles bajos de hemoglobina. En los seres humanos, los niveles elevados de EPO promueven la formación de glóbulos rojos al estimular la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En el ratón, la EPO mejora la eritropoyesis principalmente en el bazo.

35 Los efectos de la EPO están mediados por un receptor de la superficie celular que pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas. El gen del receptor de EPO humano codifica una proteína transmembrana de 483 aminoácidos, mientras que se cree que el receptor de EPO activo existe como un complejo multimérico incluso en ausencia de ligando (véase la patente estadounidense n.º 6.319.499). El receptor de EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamíferos se une a la EPO con una afinidad similar a la del receptor nativo en células 40 progenitoras eritroides. La unión de la EPO a su receptor causa un cambio conformacional que resulta en la activación del receptor y efectos biológicos, incluyendo una mayor proliferación de eritroblastos inmaduros, una mayor diferenciación de eritroblastos inmaduros y una disminución de la apoptosis en células progenitoras eritroides (Libo y col., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury y col., 1990, Science 248:378-381).

45 Los médicos utilizan diversas formas de EPO recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en una diversidad de entornos clínicos, y en particular para el tratamiento de la anemia. La anemia es una afección ampliamente definida que se caracteriza por niveles más bajos de lo normal de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre. En algunos casos, la anemia es causada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de los glóbulos rojos. Más comúnmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall y Provan 50 (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia puede ser el resultado de una reducción en la tasa de producción o una mayor tasa de destrucción de los glóbulos rojos o por la pérdida de glóbulos rojos debido al sangrado. La anemia puede deberse a una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, tratamiento de quimioterapia, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

55 El tratamiento con EPO típicamente causa un aumento de las hemoglobinas en aproximadamente 1-3 g/dl en seres humanos sanos durante un período de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, este régimen de tratamiento a menudo proporciona aumentos sustanciales en los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos y conduce a mejoras en la calidad de vida y supervivencia prolongada. La EPO no es uniformemente efectiva y muchos individuos son refractarios incluso a dosis altas (Horl y col. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Más del 50 % de los 60 pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la EPO, aproximadamente el 10 % con enfermedad renal en etapa terminal son hipersensibles (Glaspy y col. (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri y col. (1998) J Clin Oncol

16, 3412-3425), y menos del 10 % con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Diversos factores, incluidas la inflamación, la deficiencia de hierro y vitaminas, la diálisis inadecuada, la toxicidad por aluminio y el hiperparatiroidismo pueden predecir una respuesta terapéutica deficiente. Los mecanismos moleculares de resistencia a la EPO aún no están claros. La evidencia reciente sugiere que las dosis 5 más altas de EPO pueden estar asociadas con un mayor riesgo de morbilidad cardiovascular, crecimiento del tumor y mortalidad en algunas poblaciones de pacientes (Krapf y col., 2009, Clin J. Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Por lo tanto, se ha recomendado que los compuestos terapéuticos a base de EPO (agentes estimulantes de eritropoyetina, AEE) se administren a la dosis más baja suficiente para evitar la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos (Jelkmann y col., 2008, Crit Rev Oncol. Hematol 67:39-61).

10

El documento WO 2010/019261 se refiere, en parte, al uso de trampas de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos y el documento WO 2011/020045 se refiere, en parte, al uso combinado de trampas de GDF y activador del receptor de eritropoyetina para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

- 15 La eritropoyesis inefectiva es un término usado para describir un grupo de trastornos eritroides en los que la producción de eritrocitos disminuye a pesar del aumento de las etapas iniciales de la eritropoyesis (véase, por ejemplo, Tanno, 2010, Adv Hematol 2010:358283). La eritropoyesis inefectiva a menudo da lugar a anemia, niveles elevados de eritropoyetina, la formación de cantidades excesivas de precursores de glóbulos rojos y sobrecarga de hierro. Estos fenómenos pueden, a su vez, conducir a esplenomegalia, trastornos del hígado y del corazón y daños a los huesos, 20 así como a otras complicaciones. Debido a que los niveles de eritropoyetina endógena suelen ser muy altos en pacientes con eritropoyesis inefectiva, las terapias basadas en EPO a menudo no tratan la anemia en estos pacientes o pueden causar un agravamiento de otros aspectos de la enfermedad, tales como la esplenomegalia y la sobrecarga de hierro.
- 25 Por lo tanto, un objetivo de la presente descripción es proporcionar procedimientos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o abordar otros trastornos en el contexto de la eritropoyesis inefectiva.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 30 La presente invención es tal y como se define en las reivindicaciones.

En este sentido, la invención proporciona un polipéptido para su uso en el tratamiento o prevención de la sobrecarga de hierro en un paciente con talasemia, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO:1, y en el que el polipéptido 35 comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO:1. En una realización, el paciente tiene una sobrecarga de hierro tisular. En una realización adicional, el paciente tiene niveles indeseablemente altos de eritropoyetina endógena. En una realización adicional, el paciente tiene β-talasemia intermedia o β-talasemia mayor. En una realización adicional, el polipéptido aumenta los niveles de hepcidina en el paciente. En una realización adicional, el polipéptido trata o impide la cardiomiopatía por sobrecarga de hierro. En una 40 realización adicional, el polipéptido reduce la hiperabsorción de hierro en la dieta. En una realización adicional, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO:1, en la que el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO:1; o el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO:1, en la que el polipéptido comprende un 45 aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO:1. En una realización adicional, el polipéptido comprende una D en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO:1; o el polipéptido comprende una E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO:1. En una realización adicional, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29. En una realización adicional, el polipéptido es una proteína de fusión que además comprende un dominio Fc de inmunoglobulina. En una realización adicional, el 50 polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28; o el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28. En una realización adicional, el polipéptido es un homodímero; o el polipéptido inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. En una realización adicional, el polipéptido se puede administrar en combinación con un agente quelante de hierro (tal como deferroxamina, deferiprona o deferasirox) o múltiples agentes quelantes de hierro.

55

En parte, la descripción demuestra que las trampas de GDF se pueden usar para tratar la eritropoyesis inefectiva y los trastornos y síntomas que se asocian con la eritropoyesis inefectiva, que incluyen, sin limitación, anemia, esplenomegalia, sobrecarga de hierro, médula ósea hipercelular, eritropoyetina endógena elevada y daño óseo. En particular, la descripción demuestra que una trampa de GDF que es una forma soluble del polipéptido ActRIIB que 60 tiene un resto ácido en la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, cuando se administra *in vivo*, aumenta los niveles de glóbulos rojos en la sangre en sujetos normales y sanos, así como modelos animales de anemia y eritropoyesis

inefectiva. Sorprendentemente, además de aumentar directamente los niveles de glóbulos rojos, las moléculas descritas mejoran otros síntomas asociados con la eritropoyesis inefectiva, incluida la esplenomegalia, sobrecarga de hierro y daño óseo. En algunos casos, estos trastornos asociados son de igual o mayor importancia

- 5 El documento WO2010/019261 se refiere, en parte, al uso de trampas de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos y el documento WO2011/020045 se refiere, en parte, al uso combinado de trampas de GDF y activador del receptor de eritropoyetina para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

En este sentido, la invención proporciona un polipéptido para su uso en el tratamiento o prevención de la sobrecarga 10 de hierro en un paciente con talasemia, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, y en el que el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

En una realización, el paciente tiene una sobrecarga de hierro tisular.

- 15 15 En una realización adicional, el paciente tiene niveles indeseablemente altos de eritropoyetina endógena.

En una realización adicional, el paciente tiene β-talasemia intermedia o β-talasemia mayor.

- 20 20 En una realización adicional, el polipéptido aumenta los niveles de hepcidina en el paciente.

En una realización adicional, el polipéptido trata o impide la cardiomiopatía por sobrecarga de hierro.

En una realización adicional, el polipéptido reduce la hiperabsorción de hierro en la dieta.

- 25 25 En una realización adicional, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, en el que el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1; o el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, en el que 30 el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

En una realización adicional, el polipéptido comprende una D en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1; o el polipéptido comprende una E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

- 35 35 En una realización adicional, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En una realización adicional, el polipéptido es una proteína de fusión que además comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.

- 40 40 En una realización adicional, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; o el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.

En una realización adicional, el polipéptido es un homodímero; o el polipéptido inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células.

- 45 45 En una realización adicional, el polipéptido se puede administrar en combinación con un agente quelante de hierro (tal como deferoxamina, deferiprona o deferasirox) o múltiples agentes quelantes de hierro.

para la salud del paciente y la calidad de vida como condición anémica. Por lo tanto, en determinados casos, la 50 descripción proporciona procedimientos para usar trampas de GDF para aumentar los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos en pacientes y para tratar trastornos asociados con niveles bajos de glóbulos rojos en pacientes que lo necesitan. En particular, la descripción proporciona procedimientos para usar polipéptidos de la trampa de GDF para tratar complicaciones derivadas de trastornos de la eritropoyesis inefectiva, que incluyen complicaciones mayores tales como anemia, sobrecarga de hierro en los tejidos, eritropoyesis extramedular, patología ósea inducida por 55 eritroblastos y niveles de eritropoyetina inadecuadamente elevados. En tales trastornos, las trampas de GDF se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos al tiempo que reducen la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y la terapia de quelación de hierro, y por lo tanto reducen la morbilidad y la mortalidad asociadas con la acumulación de hierro en los tejidos vulnerables. En parte, una trampa de GDF se puede usar en combinación con terapias de apoyo existentes para la eritropoyesis inefectiva, incluida la transfusión de glóbulos rojos y la terapia de 60 quelación de hierro. Las trampas de GDF también se pueden usar en combinación con un agonista de hepcidina para tratar la eritropoyesis inefectiva. Como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 12/012.652, las

trampas de GDF también se pueden usar para aumentar la masa muscular y disminuir la masa grasa.

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB variantes, que incluyen polipéptidos ActRIIB que tienen truncamientos amino y carboxi terminales y alteraciones de secuencia. Opcionalmente, las trampas de GDF de la descripción pueden diseñarse para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores ActRIIB, tales como GDF8 (también llamado miostatina), GDF11, Nodal y BMP7 (también llamado OP-1). Los ejemplos de trampas de GDF incluyen un conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que tienen una afinidad mucho menor para la activina. Estas variantes muestran efectos deseables en los glóbulos rojos al tiempo que reducen los efectos en otros tejidos. Los ejemplos de tales variantes incluyen aquellos que tienen un aminoácido ácido (por ejemplo, ácido aspártico, D o ácido glutámico, E) en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1. En determinados casos, el polipéptido de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38, y polipéptidos que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores.

En determinados aspectos, la descripción proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una trampa de GDF que se une a un ligando ActRIIB tal como GDF8, GDF11, activina (por ejemplo, activina B), BMP7 o nodal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la trampa de GDF se une a un ligando ActRIIB con una Kd menor que 10 micromolar, menor que 1 micromolar, menor que 100 nanomolar, menor que 10 nanomolar o menor que 1 nanomolar. Opcionalmente, la trampa de GDF inhibe la señalización ActRIIB, tales como los eventos de transducción de señales intracelulares desencadenados por un ligando ActRIIB. Una trampa de GDF para su uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de las descritas en este documento, incluidas, por ejemplo, las trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 en la que la posición correspondiente a L79 en la SEQ1 ID NO: 1 es un aminoácido ácido. Una trampa de GDF preferida para su uso en una preparación de este tipo consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 o una secuencia de la SEQ ID NO: 2, que carece de 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 aminoácidos C terminales y que carece de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo N. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento en relación con la SEQ ID NO: 2 o 40 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N y no más de 3 aminoácidos en el extremo C. Una trampa de GDF puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, en el dominio de unión al ligando) en relación con un polipéptido ActRIIB de origen natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariótica o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIB de origen natural.

Una trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB con una o más variaciones de secuencia) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, dirección a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de la estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos de proteínas, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Las proteínas de fusión de la trampa de GDF pueden incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo natural o mutante) o una albúmina sérica. En determinados casos, una fusión de la trampa de GDF comprende un enlazador relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio ActRIIB extracelular. Este enlazador no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 5, 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria. Un enlazador puede ser rico en restos de glicina y prolina y puede contener, por ejemplo, secuencias de repetición de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones de TG4 (SEQ ID NO: 13) o SG4 (SEQ ID NO:14)) o una serie de tres glicinas. Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítopo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión con GST. En determinados casos, una fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede ser una secuencia nativa de ActRIIB o una secuencia líder heteróloga. En determinados casos, la secuencia líder es una secuencia líder del activador del plasminógeno tisular (TPA). En un caso, una proteína de fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula ABC. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado en el extremo N y C que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 2 o 40. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, una o

más de un aminoacido, y ambas porciones A y B son heterólogas a B. Las porciones A y/o C pueden unirse a la porción B mediante una secuencia enlazadora.

- Opcionalmente, una trampa de GDF incluye un polipéptido ActRIIB variante que tiene uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados de entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico, y un aminoácido conjugado a un agente de derivación orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Preferentemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que 5 una trampa de GDF se exprese en una línea celular de mamífero que media adecuadamente la glicosilación natural de la trampa de GDF para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente. Las líneas 10 de células humanas y CHO se han usado con éxito, y se espera que otros vectores de expresión comunes de mamíferos serán útiles.
- 15 En determinados aspectos, la descripción proporciona productos farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en este documento y marcada para su uso en el aumento de los niveles de glóbulos rojos en un ser humano.

En determinados aspectos, la descripción proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB solubles que 20 comprenden un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, unión a GDF8). Las trampas de GDF con dominios de unión a ligando alterados pueden comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en los restos de aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es en relación con la SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una 25 selectividad incrementada para un ligando tal como GDF8/GDF11 en relación con un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, se demuestra en este documento que estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 (y, por lo tanto, presumiblemente, GDF8) sobre activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto contrario, aumentando la relación de unión de activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) 30 puede aumentarse mediante la inclusión de la región de "cola" o, presumiblemente, una región enlazadora no estructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que causaron una disminución global en la afinidad de unión a ligando, incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se pueden combinar para lograr los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las 35 mutaciones que afectan la relación de GDF11:unión a activina tienen un efecto negativo global sobre la unión al ligando, y por lo tanto, estas pueden combinarse con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando. En un caso ejemplar, una trampa de GDF es un polipéptido AcRIIB que comprende una mutación F79D o F79E, opcionalmente en combinación con sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos adicionales.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de K_d 40 para la unión a activina a K_d para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con la relación para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de CI50 para la inhibición de activina a CI50 para la inhibición de GDF8/GDF11 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a ligando ASctRIIB de tipo natural. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado 45 inhibe GDF8/GDF11 con una CI50 al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la CI50 para la inhibición de activina. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (ya sea de tipo natural o mutante). En determinados casos, las trampas de GDF solubles objetivo son antagonistas (inhibidores) de GDF8 y/o GDF11.

50 Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de fusión de la trampa de GDF que comprende una porción derivada de la secuencia ActRIIB de la SEQ ID NO: 1 o 39 y una segunda porción polipeptídica, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente que comienza en los 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39) y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39, y en la que la proteína de fusión de la trampa de 55 GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente que comienza en los 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que 60 comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente que comienza en los 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La

proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de 5 la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de 10 la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de 15 la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de 20 la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 y que finaliza en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Sorprendentemente, las construcciones que comienzan en los 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39 tienen niveles de actividad mayores que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de 25 ActRIIB humano. En un caso preferido, la proteína de fusión de la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente o consiste en una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en la posición del aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 1 o 39. En otro caso preferido, el polipéptido de la trampa de GDF consiste, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. Cualquier de las proteínas de fusión de la trampa de GDF se pueden producir como un homodímero. 30 Cualquier de las proteínas de fusión de la trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquier de las proteínas de fusión de la trampa de GDF anteriores puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

35 Se contemplan otras proteínas de la trampa de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de la trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, en la que la posición correspondiente a 64 de la SEQ ID NO: 1 es una R o K, y en la que la proteína de la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado 40 en células. La proteína de la trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 se coloca fuera del bolsillo de unión al ligando. La proteína de la trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora posicionada dentro del bolsillo de unión al ligando. La proteína de la trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones 45 seleccionadas de entre el grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y F79. La proteína de la trampa de GDF anterior, en la que la proteína comprende al menos una secuencia NXS/T en una posición diferente a una secuencia endógena NXS/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando.

Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de la trampa de GDF que comprende 50 una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, y en la que la proteína comprende al menos una secuencia NXS/T en una posición diferente a una secuencia endógena NXS/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína de la trampa de GDF comprende una N en la posición correspondiente a la posición 24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y una S o T en la posición correspondiente a la posición 26 de la SEQ ID NO: 1 o 39, y en la 55 que la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína de la trampa de GDF comprende una R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína ActRIIB comprende una D o E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y en la que la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF 60 anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora posicionada dentro del bolsillo de unión al ligando. La trampa de GDF anterior, en la que al menos una

alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína es una proteína de fusión que además comprende una porción heteróloga. Cualquiera de las proteínas de fusión de la trampa de GDF se pueden producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de la 5 trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc.

- En determinados aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de codificación para un polipéptido de la trampa de GDF soluble, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia 10 que codifica una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB que tiene una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un polipéptido ActRIIB, excepto para un codón de parada posicionado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o posicionado entre el dominio 15 extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica una trampa de GDF puede comprender una secuencia de polinucleótido ActRIIB de longitud completa, tal como la SEQ ID NO: 4 que tiene una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 20 3' o posicionado de otra manera tal que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden unirse operativamente a un promotor para la expresión, y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.
- 25 En determinados aspectos, la descripción proporciona procedimientos para fabricar un polipéptido de la trampa de GDF. Un procedimiento de este tipo puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31) descritos en este documento en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Dicho procedimiento puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de la trampa de GDF, en el que dicha célula se transforma con una construcción de 30 expresión de la trampa de GDF; y b) recuperar el polipéptido de la trampa de GDF así expresado. Los polipéptidos de la trampa de GDF pueden recuperarse como fracciones brutas, parcialmente purificadas o altamente purificadas utilizando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteínas de cultivos celulares.

En determinados aspectos, un polipéptido de la trampa de GDF descrito en este documento puede usarse en un 35 procedimiento para promover la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. En determinados casos, la descripción proporciona procedimientos para tratar un trastorno asociado con bajos recuentos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina (por ejemplo, una anemia, síndrome mielodisplásico, etc.), o para promover la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un polipéptido de la trampa de GDF. En determinados 40 aspectos, la descripción proporciona usos de polipéptidos de la trampa de GDF para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en este documento.

En parte, la descripción demuestra que las trampas de GDF se pueden usar en combinación (por ejemplo, administradas al mismo tiempo o en diferentes momentos, pero generalmente de manera tal que se logren efectos 45 farmacológicos superpuestos) con activadores del receptor de EPO para aumentar los niveles de glóbulos rojos (eritropoyesis) o tratar la anemia en pacientes que lo necesiten. En parte, la descripción demuestra que una trampa de GDF puede administrarse en combinación con un activador del receptor de EPO para aumentar sinérgicamente la formación de glóbulos rojos en un paciente. Por lo tanto, el efecto de este tratamiento combinado puede ser significativamente mayor que la suma de los efectos de la trampa de GDF y el activador del receptor de EPO cuando 50 se administran por separado a sus dosis respectivas.

En determinados casos, esta sinergia puede ser ventajosa dado que permite que se alcancen los niveles objetivo de glóbulos rojos con dosis más bajas de un activador del receptor de EPO, evitando así los posibles efectos adversos u otros problemas asociados con niveles más altos de la activación del receptor de EPO.

55 Un activador del receptor de EPO puede estimular la eritropoyesis mediante el contacto directo y la activación del receptor de EPO. En determinados casos, el activador del receptor de EPO es uno de una clase de compuestos basados en la secuencia de 165 aminoácidos de la EPO nativa y generalmente conocidos como agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE), cuyos ejemplos son epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta y epoetina omega. En otros 60 casos, los AEE incluyen proteínas de EPO sintéticas (SEP) y derivados de EPO con modificaciones no peptídicas que confieren propiedades farmacocinéticas deseables (semivida circulante prolongada), cuyos ejemplos son darbepoetin

alfa y metoxi-polietilenglicol epoetina beta. En determinados casos, un activador del receptor de EPO puede ser un agonista del receptor de EPO que no incorpora la estructura del polipéptido de EPO o no está clasificado generalmente como un AEE. Tales agonistas del receptor de EPO pueden incluir, pero no se limitan a, miméticos peptídicos y no peptídicos de EPO, anticuerpos agonistas dirigidos al receptor de EPO, proteínas de fusión que comprenden un 5 dominio mimético de EPO y agonistas del receptor de eritropoyetina de duración prolongada limitada (EREDLA).

En determinados casos, un activador del receptor de EPO puede estimular la eritropoyesis indirectamente, sin ponerse en contacto con el receptor de EPO en sí, al mejorar la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimuladores endógenos de la expresión del gen EPO que se suprime 10 (desestabilizan) en condiciones normóxicas por mecanismos reguladores celulares. En parte, la descripción proporciona un aumento de la eritropoyesis en un paciente mediante el tratamiento combinado con una trampa de GDF y un activador del receptor de EPO indirecto con propiedades estabilizadoras de HIF, tal como un inhibidor de la prolil hidroxilasa.

- 15 En determinados aspectos, la descripción proporciona procedimientos para administrar un polipéptido de la trampa de GDF a un paciente. En parte, la descripción demuestra que los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar para aumentar los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos. En parte, la descripción demuestra que los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar para tratar pacientes con eritropoyesis inefectiva y para reducir una o más afecciones asociadas con la eritropoyesis inefectiva, tal como anemia, esplenomegalia, sobrecarga de hierro o trastornos óseos.
- 20 En determinados aspectos, la descripción proporciona procedimientos para usar polipéptidos de la trampa de GDF para tratar la eritropoyesis inefectiva en un paciente con talasemia mientras reduce la necesidad de transfusión de glóbulos rojos y reduce la morbilidad y la mortalidad asociadas con la deposición de hierro en tejidos vulnerables. En particular, un polipéptido de la trampa de GDF puede usarse de esta manera para tratar los síndromes de β-talasemia, incluida la β-talasemia intermedia. Los polipéptidos de la trampa de GDF también se pueden usar para tratar o impedir 25 otros usos terapéuticos, tales como promover el crecimiento muscular. En determinados casos, cuando se administra un polipéptido de la trampa de GDF para promover el crecimiento muscular, puede ser conveniente monitorizar los efectos sobre los glóbulos rojos durante la administración del polipéptido de la trampa de GDF, o determinar o ajustar la dosificación del polipéptido de la trampa de GDF, con el fin de para reducir los efectos no deseados en los glóbulos rojos. Por ejemplo, los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina o los niveles de 30 hematocrito pueden causar aumentos en la presión arterial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un alineamiento de los dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 15) y ActRIIB 35 humano (SEQ ID NO: 2) con los restos que se deducen en este documento, sobre la base del análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para contactar directamente el ligando (el bolsillo de unión al ligando) indicado con recuadros.

La figura 2 muestra una alineamiento de secuencias múltiples de diversas proteínas ActRIIB de vertebrados y ActRIIA 40 humana (SEQ ID NO: 16-23).

La figura 3 muestra la secuencia completa de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), incluida la secuencia líder TPA (doble subrayado), dominio extracelular ActRIIB (restos 20-134 en la SEQ ID NO: 1; subrayado), y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado 45 y resaltado doble, al igual que la glicina revelada por secuenciación como el resto N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB (L79D 20-134)-hFc. La SEQ ID NO: 25 corresponde a la cadena con sentido, y la SEQ ID NO: 33 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA 50 (nucleótidos 1-66) está subrayado doble y el dominio extracelular ActRIIB (nucleótidos 76-420) está subrayado.

La figura 5 muestra la secuencia completa de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 26), incluido el líder TPA (doble subrayado), dominio extracelular ActRIIB truncado (restos 25-131 en la SEQ ID NO: 1; subrayado), y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado 55 y resaltado doble, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el resto N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. La SEQ ID NO: 27 corresponde a la cadena con sentido, y la SEQ ID NO: 34 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA 60 (nucleótidos 1-66) está subrayado doble y el dominio extracelular ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular ActRIIB (restos 25-131 en

la SEQ ID NO:1).

La figura 7 muestra la secuencia completa de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB truncada (L79D 25-131)-hFc (sin un líder (SEQ ID NO: 28). El dominio extracelular ActRIIB truncado (restos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado y resaltado doble, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el resto N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB (F79D 25-131) sin el líder, el dominio hFc y el enlazador (SEQ ID NO: 29). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el resto N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB (F79D 25-131)-hFc. La SEQ ID NO: 30 corresponde a la cadena con sentido, y la SEQ ID NO: 35 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1-66) está subrayado doble, el dominio extracelular ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado, y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo natural del dominio extracelular están subrayadas y resaltadas dobles (en comparación con la SEQ ID NO: 27, figura 6). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular ActRIIB (restos 25-131 en la SEQ ID NO:1).

20 La figura 10 muestra los nucleótidos 76-396 (SEQ ID NO: 31) de la secuencia de nucleótidos alternativa mostrada en la figura 9 (SEQ ID NO: 30). Las mismas sustituciones de nucleótidos indicadas en la figura 9 también están subrayadas y resaltadas en este caso. La SEQ ID NO: 31 codifica solo el dominio extracelular ActRIIB truncado (correspondiente a los restos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) con una sustitución L79D, por ejemplo, ActRIIB (L79D 25-131).

25 La figura 11 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en la concentración de hemoglobina en un modelo de ratón de la anemia inducida por quimioterapia. Los datos son medias ± SEM. **, P <0,01 frente a paclitaxel en el mismo punto de tiempo. Esta trampa de GDF compensó la anemia inducida por el tratamiento con paclitaxel.

30 La figura 12 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de ratones nefrectomizados unilateralmente (NEPHX) de la enfermedad renal crónica. Los datos son medias ± SEM. ***, P <0,001 frente al valor inicial. Esta trampa de GDF revirtió la anemia inducida por nefrectomía observada en ratones de control.

35 La figura 13 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB) y niveles de hematocrito (HCT) en un modelo de ratones nefrectomizados unilateralmente (NEPHX) de la enfermedad renal crónica. Los datos son cambios medios desde el valor inicial durante 4 semanas (± SEM). *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001 frente a los controles de NEPHX. Esta trampa de GDF impidió el declive asociado con la nefrectomía en estos parámetros eritrocíticos, aumentando cada uno en una magnitud similar a la de los ratones intactos (simulados) 40 de riñón.

La figura 14 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de rata de la anemia inducida por pérdida de sangre aguda. La extracción de sangre se produjo en el día -1, con una dosis en los días 0 y 3. Los datos son medias ± SEM. **, P <0,01; ***, P <0,001 frente a vehículo en el mismo punto 45 de tiempo. Esta trampa de GDF mejoró la velocidad y el grado de recuperación de la anemia inducida por la pérdida de sangre.

La figura 15 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (negro) en el cambio absoluto en la concentración de glóbulos rojos desde el valor inicial en monos cynomolgus. VEH 50 = vehículo. Los datos son medias + SEM. n = 4-8 por grupo.

La figura 16 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (negro) en el cambio absoluto en el hematocrito desde el valor inicial en monos cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias + SEM. n = 4-8 por grupo.

55 La figura 17 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (negro) en el cambio absoluto en la concentración de hemoglobina desde el valor inicial en monos cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias + SEM. n = 4-8 por grupo.

60 La figura 18 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (negro) en el cambio absoluto en la concentración de reticulocitos circulantes desde el valor inicial en monos

cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias + SEM. n = 4-8 por grupo.

La figura 19 muestra el efecto del tratamiento combinado con eritropoyetina (EPO) y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas en el hematocrito en ratones. Los datos son medias ± SEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$, ensayo t para muestras independientes) se designan con letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó el hematocrito en un 23 % en comparación con el vehículo, un aumento sinérgico mayor que la suma de los efectos separados de EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc.

La figura 20 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas en las concentraciones de hemoglobina en ratones. Los datos son medias ± SEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) se designan con letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó las concentraciones de hemoglobina en un 23 % en comparación con el vehículo, lo que también fue un efecto sinérgico.

15 La figura 21 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas en las concentraciones de glóbulos rojos en ratones. Los datos son medias ± SEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) se designan con letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó las concentraciones de glóbulos rojos en un 20 % en comparación con el vehículo, lo que también fue un efecto sinérgico.

20 La figura 22 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas en varias células precursoras eritropoyéticas en el bazo de ratón. Los datos son medias ± SEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,01$) se designan con letras diferentes. Mientras que la EPO sola aumentó considerablemente el número de eritroblastos basófilos (BasoE) a expensas de la maduración del 25 precursor en etapa tardía, el tratamiento combinado aumentó los números de BasoE en una medida menor pero aún significativa al tiempo que apoya la maduración no disminuida de los precursores en etapa tardía.

La figura 23 compara los parámetros en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de la β-talasemia con los de ratones de tipo natural (WT). Se analizaron muestras de sangre de ratones no tratados a los 2 a 6 meses de edad para determinar el número 30 de glóbulos rojos (RBC; A), hematocrito (HCT; B) y la concentración de hemoglobina (Hgb; C). Los datos son medias + SEM. (n = 4 por grupo), $p < 0,001$. Se confirmó que los ratones $Hbb^{-/-}$ estaban gravemente anémicos.

La figura 24 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en el número de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de la β-talasemia. Las muestras de sangre se recogieron después de 4 semanas de tratamiento. Los datos son medias 35 de 2 por grupo, con barras que indican el intervalo. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc redujo a la mitad el déficit de RBC presente en ratones $Hbb^{-/-}$.

La figura 25 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en la morfología de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de la β-talasemia. Se obtuvieron imágenes de frotis de sangre teñida con Giemsa de ratones tratados durante 40 4 semanas con un aumento de 100. Observe la hemólisis, los desechos celulares y muchos RBC pequeños o de forma irregular en la sangre del ratón $Hbb^{-/-}$ tratado con vehículo. En comparación, el tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc redujo en gran medida la hemólisis, los desechos y la aparición de RBC de forma irregular, al tiempo que aumenta el número de RBC de forma normal.

45 La figura 26 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses en el número de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de la β-talasemia, con datos de ratones de tipo natural con dosis de vehículo incluidos para la comparación. Los datos son medias ± SEM; n = 7 por grupo. **, $P < 0,01$ frente a ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131) -mFc redujo el déficit medio de RBC en ratones $Hbb^{-/-}$ en más de un 50 %.

50 La figura 27 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (F79D 25-131)-mFc durante 2 meses en los niveles séricos de bilirrubina en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de la β-talasemia, con datos de ratones de tipo natural con dosis de vehículo incluidos para la comparación. Los datos son medias ± SEM. # # #, $P < 0,001$ frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, $P < 0,05$ frente a ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB (F79D 25-131)-mFc 55 redujo significativamente los niveles totales de bilirrubina en ratones $Hbb^{-/-}$.

La figura 28 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (F79D 25-131)-mFc durante 2 meses en el nivel de EPO en suero en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de la β-talasemia, con datos de ratones de tipo natural con dosis de vehículo incluidos para la comparación. Los datos son medias ± SEM. # # #, $P < 0,001$ frente a ratones de tipo natural tratados 60 con vehículo; *, $P < 0,05$ frente a ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo los niveles medios de EPO circulante en más de un 60 % en ratones $Hbb^{-/-}$.

- La figura 29 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc en la esplenomegalia en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de la β-talasemia, con datos de ratones de tipo natural con dosis de vehículo incluidos para la comparación. A. Medias ± SEM de ratones a partir de los 3 meses de edad después del tratamiento con 1 mg/kg dos veces por semana durante 5 2 meses. # # #, P < 0,001 frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, P < 0,05 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. B. Tamaños de bazo representativos, como se observó en un estudio separado en ratones a partir de los 6-8 meses de edad después del tratamiento con 1 mg/kg dos veces por semana durante 3 meses. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc redujo significativamente el peso del bazo en ratones *Hbb^{-/-}*.
- 10 La figura 30 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses en la densidad mineral ósea en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de la β-talasemia, con datos de ratones de tipo natural con dosis de vehículo incluidos para la comparación. Medias ± SEM basadas en un análisis de fémur. #, P <0,05 frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, P <0,05 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc normalizó la densidad mineral ósea en ratones *Hbb^{-/-}*.
- 15 La figura 31 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses en los parámetros de la homeostasis del hierro en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de la β-talasemia. Medias ± SEM para hierro sérico (A), ferritina sérica (B) y saturación de transferina (C). *, P <0,05; **, P <0,01 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc redujo significativamente cada medida de sobrecarga de hierro en ratones 20 *Hbb^{-/-}*.
- La figura 32 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses en la sobrecarga de hierro tisular en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de la β-talasemia. Los niveles de hierro en las secciones de tejido (200 µm) de bazo (AC), hígado (DF) y riñón (GI) se determinaron mediante tinción con azul de Prussian de Perl. La tinción con 25 hierro en el bazo natural (A) fue abundante en la pulpa roja (flechas) pero ausente en la pulpa blanca (*). El aumento de la tinción con hierro en el bazo de los ratones *Hbb^{-/-}* refleja la expansión de las regiones de pulpa roja debido a la eritropoyesis extramedular. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc en ratones *Hbb^{-/-}* disminuyeron la eritropoyesis esplénica y restauraron el patrón natural de la tinción esplénica de hierro (C). Además, la tinción anormal de hierro en las células de Kupffer hepáticas (H, flechas) y la corteza renal (E, flechas) de ratones *Hbb^{-/-}* se normalizó mediante ActRIIB(L79D 30 25-131)-mFc (F e I). Aumento, 200.
- La figura 33 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses en los niveles hepáticos de ARNm de hepcidina en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de la β-talasemia. Medias ± SEM; *, P <0,05 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc aumentó significativamente la 35 expresión de ARNm de hepcidina en ratones *Hbb^{-/-}*.
- La figura 34 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc en los niveles circulantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia, con datos de ratones de tipo natural con dosis de vehículo incluidos para la comparación. Los datos son medias geométricas ± SEM. # ##, P < 0,001 frente a ratones de tipo 40 natural tratados con vehículo; ***, P < 0,001 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc redujo significativamente las ROS en ratones *Hbb^{-/-}*.
- DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**
- 45 1. Visión general
- La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran diversidad de tipos de células tanto en vertebrados como en invertebrados. Los 50 miembros de la superfamilia desempeñan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una diversidad de procedimientos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiógenésis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. Al manipular la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, la raza bobina Piedmontese y belga azul tienen una 55 mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que causa un marcado aumento en la masa muscular. Grobet y col., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 se asocian con una mayor masa muscular y, según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke y col., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.
- 60 Las señales de TGF-β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina quinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad cadena abajo de la estimulación del ligando (Massagué, 2000,

Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización. Los receptores de tipo II son necesarios para unir ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores 5 de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión al ligando, lo que resulta en la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

Dos receptores de tipo II relacionados (ActRII), ActRIIA y ActRIIB, se han identificado como los receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano y col., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, 10 ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias proteínas diferentes de la familia TGF- β , incluidas BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita y col., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh y col., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 es el receptor primario de tipo I para activinas, particularmente para activina A, y ALK-7 también puede servir como un receptor para activinas, particularmente para activina B. La presente invención se refiere a antagonizar un ligando de 15 receptores ActRIIB (también conocido como un ligando ActRIIB) con un polipéptido de la trampa de GDF objetivo. Los ligandos ejemplares de los receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia TGF- β , tales como activina A, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento de polipéptidos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. 20 Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, y $\beta_A\beta_B$, respectivamente). El genoma humano también codifica una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y las formas heterodiméricas que contienen β_C o β_E también son conocidas. En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, favorecen la supervivencia de las células neuronales, 25 influyen en el progreso del ciclo celular de manera positiva o negativa dependiendo del tipo de célula e inducen la diferenciación mesodérmica al menos en anfibios embriones (DePaolo y col., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson y col., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Además, se descubrió que el factor de diferenciación eritroide (FED) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata y col., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A promueve la 30 eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) de la hipófisis, la activina promueve la secreción y síntesis de la FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y la síntesis de la FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada con la folistatina (FSRP) y la α_2 -macroglobulina.

35 Las proteínas nodales tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y el endodermo, así como la organización posterior de estructuras axiales tal como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la notocorda y la placa precordal mientras recluta las células circundantes para formar 40 estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece emitir señales a través de los receptores tipo I y tipo II y los efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma y col., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Se sugiere que los ligandos nodales interactúan con sus cofactores (por ejemplo, cripto) para activar los receptores de activina tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas nodales están implicadas en muchos eventos críticos para el embrión vertebrado 45 temprano, incluida la formación de mesodermo, el patrón anterior y la especificación del eje izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización nodal activa a pAR3-Lux, un reportador de luciferasa que anteriormente demostró responder específicamente a la activina y al TGF-beta. Sin embargo, Nodal no puede inducir pTlx2-Lux, un reportador que responde específicamente a las proteínas morfogenéticas óseas. Los resultados recientes proporcionan evidencia bioquímica directa de que la señalización nodal está mediada por la vía de activina- 50 TGF-beta Smads, Smad2 y Smad3. Otra evidencia ha demostrado que la proteína cripto extracelular es necesaria para la señalización nodal, distinguiéndola de la señalización de activina o TGF-beta.

El factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF8) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo 55 de la masa muscular esquelética. GDF8 es altamente expresado en el músculo esquelético en desarrollo y adulto. La mutación nula GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron y col., Nature, 1997, 387:83-90). Aumentos similares en la masa muscular esquelética son evidentes en las mutaciones naturales de GDF8 en el ganado (Ashmore y col., 1974, Growth, 38:501-507; Swatland y Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; y Kambadur y col., Genome Res., 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en seres humanos (Schuelke y col., N Engl J Med 2004; 350:2682-8). Los estudios también han demostrado que el desgaste muscular asociado con la infección por VIH en seres humanos se acompaña de aumentos en la expresión de la proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid y col.,

PNAS, 1998, 95:14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas de los músculos (por ejemplo, creatina quinasa) y modular la proliferación de células de mioblastos (documento WO 00/43781). El propéptido GDF8 puede unirse de manera no covalente al dímero del dominio GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono y col., (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield y col. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-5 7654; y Brown y col. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o proteínas relacionadas estructuralmente e inhiben su actividad biológica incluyen la folistatina y, potencialmente, las proteínas relacionadas con la folistatina (Gamer y col. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

- El factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada 10 (McPherron y col., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en la yema de la cola, la yema de la extremidad, los arcos maxilares y mandibulares, y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima y col., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 desempeña un papel único en el modelado de tejidos tanto mesodérmicos como neurales (Gamer y col., 1999, Dev Biol., 208:222-32). GDF11 demostró ser un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de la extremidad del pollo (Gamer y col., 2001, Dev Biol. 229:407-20). 15 La expresión de GDF11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de manera similar al GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se descubrió que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu y col., 2003, Neuron. 37:197-207).
- 20 La proteína morfogenética ósea (BMP7), también llamada proteína osteogénica-1 (OP-1), es bien conocida por inducir la formación de cartílago y hueso. Además, BMP7 regula un amplio conjunto de procedimientos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 puede ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se descubre que BMP7 desempeña un papel en la regulación del calcio y la homeostasis ósea. Al igual que la activina, BMP7 se une a los receptores tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, BMP7 y la activina reclutan distintos receptores 25 de tipo I en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor de BMP7 tipo I observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y la activina provocaron distintas respuestas biológicas y activaron diferentes vías de Smad (Macias-Silva y col., 1998, J. Biol Chem. 273:25628-36).

- Como se demuestra en este documento, un polipéptido de la trampa de GDF, que es un polipéptido variante ActRIIB 30 (ActRIIB), es más efectivo para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo* en comparación con un polipéptido ActRIIB soluble de tipo natural y tiene efectos beneficiosos en una diversidad de modelos para anemias y eritropoyesis inefectiva. Además, se muestra que el uso de un polipéptido de la trampa de GDF en combinación con un activador del receptor de EPO provoca un aumento sustancial en la formación de glóbulos rojos. Cabe señalar que la hematopoyesis es un procedimiento complejo, regulado por una diversidad de factores, que incluyen eritropoyetina, 35 G-CSF y homeostasis del hierro. Las expresiones "aumentan los niveles de glóbulos rojos" y "promueven la formación de glóbulos rojos" se refieren a métricas clínicamente observables, tales como el hematocrito, los recuentos de glóbulos rojos y las mediciones de hemoglobina, y pretenden ser neutrales en cuanto al mecanismo por el cual se producen tales cambios.
- 40 Además de estimular los niveles de glóbulos rojos, los polipéptidos de la trampa de GDF son útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, promover el crecimiento muscular (véase los números de publicaciones PCT WO 2006/012627 y WO 2008/097541).

- En determinados casos, cuando se administra un polipéptido de la trampa de GDF con el objetivo de aumentar el 45 músculo, puede ser deseable reducir o minimizar los efectos en los glóbulos rojos. Al monitorizar diversos parámetros hematológicos en pacientes tratados con, o que son candidatos para el tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF, se puede determinar la dosis adecuada (incluidas las cantidades y la frecuencia de administración) según las necesidades de cada paciente, los parámetros hematológicos iniciales y el objetivo para el tratamiento. Además, el progreso y los efectos terapéuticos en uno o más parámetros hematológicos a lo largo del tiempo pueden ser útiles 50 para administrar a los pacientes que reciben un polipéptido de la trampa de GDF al facilitar la atención del paciente, determinar la dosis de mantenimiento adecuada (tanto en cantidades como en frecuencia), etc.

- La EPO es una hormona glicoproteica involucrada en el crecimiento y la maduración de las células progenitoras eritroides en eritrocitos. La EPO es producida por el hígado durante la vida fetal y por el riñón en adultos. La 55 disminución de la producción de EPO, que comúnmente se produce en adultos como consecuencia de la insuficiencia renal, conduce a la anemia. La EPO se ha producido mediante técnicas de ingeniería genética basadas en la expresión y la secreción de la proteína de una célula huésped transfectada con el gen EPO. La administración de dicha EPO recombinante ha sido eficaz en el tratamiento de la anemia. Por ejemplo, Eschbach y col. (1987, N Engl J Med 316:73) describen el uso de EPO para corregir la anemia causada por insuficiencia renal crónica.

- 60 Los efectos de la EPO están mediados a través de su unión y activación de un receptor de la superficie celular que

pertenece a la superfamilia del receptor de citoquinas y se designa el receptor de la EPO.

Los receptores de EPO humanos y murinos se han clonado y expresado (D'Andrea y col., 1989, Cell 57:277; Jones y col., 1990, Blood 76:31; Winkelman y col., 1990, Blood 76:24; documento WO 90/08822/patente estadounidense n.º 5.278.065). El gen del receptor de EPO humano codifica una proteína transmembrana de 483 aminoácidos que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 224 aminoácidos y muestra aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el receptor de EPO murino (véase la patente estadounidense n.º 6.319.499). El receptor de EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamífero (66-72 kDa) se une a la EPO con una afinidad ($K_D = 100-300$ nM) similar a la del receptor nativo en células progenitoras eritroides. Por lo tanto, se cree que esta forma contiene el principal determinante de unión a EPO y se denomina el receptor de EPO. Por analogía con otros receptores de citoquinas estrechamente relacionados, se cree que el receptor de EPO se dimeriza con la unión del agonista. Sin embargo, la estructura detallada del receptor de EPO, que puede ser un complejo multimérico, y su mecanismo específico de activación no se comprenden completamente (patente estadounidense n.º 6.319.499).

La activación del receptor de EPO produce varios efectos biológicos. Estos incluyen una mayor proliferación de eritroblastos inmaduros, una mayor diferenciación de eritroblastos inmaduros y una disminución de la apoptosis en células progenitoras de eritroides (Liboi y col., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury y col., 1990, Science 248:378-381). Las vías de transducción de señales del receptor de EPO que median en la proliferación y diferenciación parecen ser distintas (Noguchi y col., 1988, Mol Cell Biol 8:2604; Patel y col., 1992, J Biol Chem 1992, 267:21300; Liboi y col. ibid.). Algunos resultados sugieren que puede requerirse una proteína accesoria para la mediación de la señal de diferenciación (Chiba y col., 1993, Nature 362:646; Chiba y col., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11593); sin embargo, existe controversia con respecto al papel de las proteínas accesorias en la diferenciación, ya que una forma activada constitutivamente del receptor puede estimular tanto la proliferación como la diferenciación (Pharr y col., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:938).

Los activadores del receptor de EPO incluyen agentes estimulantes de la eritropoyesis de moléculas pequeñas (AEE), así como compuestos basados en la EPO. Un ejemplo del primero es un agonista basado en péptidos diméricos unidos covalentemente a polietilenglicol (nombre patentado Hematide), que ha mostrado propiedades estimulantes de la eritropoyesis en voluntarios sanos y en pacientes con enfermedad renal crónica y anticuerpos anti-EPO endógenos (Stead y col., 2006, Blood 108:1830-1834; Macdougall y col., 2009, N Engl J Med 361:1848-1855). Otros ejemplos incluyen AEE no basados en péptidos (Qureshi y col., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161).

Los activadores del receptor de EPO también incluyen compuestos que estimulan la eritropoyesis indirectamente, sin ponerse en contacto con el receptor de EPO en sí, al mejorar la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimuladores endógenos de la expresión del gen EPO que se suprimen (desestabilizan) en condiciones normoxicas por mecanismos reguladores celulares. Por lo tanto, los inhibidores de las enzimas HIF prolij hidroxilasa se están investigando para determinar la actividad inductora de EPO *in vivo*. Otros activadores indirectos del receptor de EPO incluyen inhibidores del factor de transcripción GATA-2 (Nakano y col., 2004, Blood 104:4300-4307), que inhibe tónicamente la expresión del gen EPO, e inhibidores de la fosfatasa de células hemopoyéticas (HCP o SHP-1), que funciona como un regulador negativo de la transducción de señales del receptor de EPO (Klingmuller y col., 1995, Cell 80:729-738).

Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Determinados términos se explican a continuación o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al médico en la descripción de las composiciones y los procedimientos de la descripción y cómo realizarlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.

“Alrededor de” y “aproximadamente” significarán generalmente un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10 %, y más preferentemente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado.

Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, los términos “alrededor de” y “aproximadamente” pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y más preferentemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en este documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término “alrededor de” o “aproximadamente” se puede inferir cuando no se indica expresamente.

Los procedimientos de la descripción pueden incluir etapas para comparar secuencias entre sí, incluyendo secuencias

de tipo natural con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineamientos de secuencias de polímeros, por ejemplo, el uso de programas de alineamiento de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). El experto en la materia puede apreciar fácilmente que, en dichos alineamientos, cuando una mutación contiene una inserción o eliminación de restos, el alineamiento de la secuencia introducirá un "hueco" (representado típicamente por un guión, o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el resto insertado o eliminado.

"Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluidas las proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como las proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Dichas proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen una homología de secuencia, como se refleja en su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de restos o motivos específicos y posiciones conservadas.

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

Sin embargo, en el uso común y en la aplicación instantánea, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos de la trampa de GDF

En determinados aspectos, la descripción se refiere a polipéptidos de la trampa de GDF, por ejemplo, polipéptidos ActRIIB variantes solubles, que incluyen, por ejemplo, fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas de polipéptidos ActRIIB. En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF tienen al menos una actividad biológica similar o igual a la del polipéptido ActRIIB de tipo natural correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF de la descripción puede unirse e inhibir la función de un ligando ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido de la trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos. Los ejemplos de polipéptidos de la trampa de GDF incluyen polipéptidos precursores de ActRIIB humanos (SEQ ID NO: 1 o 39) que tienen una o más variaciones de secuencia, y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41) que tienen una o más variaciones de secuencia.

Como se usa en este documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas receptoras de activina de tipo IIb (ActRIIB) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIB en este documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con una prevista actividad serina/treonina quinasa. Las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular soluble ActRIIA humano (proporcionado para la comparación) y el dominio extracelular soluble ActRIIB se ilustran en la figura 1.

El término "polipéptido ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y opcionalmente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o de mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o la activina. Un polipéptido ActRIIB que es una trampa de GDF puede seleccionarse por su actividad para promover la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen el polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 y 39) y los polipéptidos ActRIIB humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). La numeración de los aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en este documento se basa en la numeración de la SEQ ID NO:1, a menos que se indique específicamente lo contrario.

La secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humana es la siguiente:

MTAPWVALALLWGSIWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWRN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKMRPTIK

DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

5 (SEQ ID NO: 1)

El péptido señal está solo subrayado; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de glicosilación unidos a N están en recuadros.

- 10 Una forma con una alanina en la posición 64 también se informa en la bibliografía, como sigue:

MTAPWVALALLWGSIWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

15 (SEQ ID NO: 39)

La secuencia polipeptídica procesada soluble (extracelular) humana ActRIIB es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPPTAPT

(SEQ ID NO: 2)

5 La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPPTAPT

(SEQ ID NO: 40)

10 En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia “SGR ...” en el extremo N. La “cola” C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la “cola” eliminada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA !

(SEQ ID NO: 3)

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

20 GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA

(SEQ ID NO: 41)

25 En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia “SGR ...” en el extremo N. La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de Genbank entrada NM_001106) (la secuencia que se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una arginina)

ES 2 741 477 T3

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTGCCCTCCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACCTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTGCCAGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
AGCCCCCACCTGCTCACGGTGCTGGCTACTCACTGCTGCCATCGGG
GGCCTTCCCTCATCGTCTGCTGGCTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGCCTCCACC
ACCATCCCCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTGGGGCGCTTGGCTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCCTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGAACATCATCACATGGAACGAACCTGTGTATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTCTACACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTCCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGT
CCAGAGAGATGCCCTCGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGT
CTGTGGGAGCTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
AGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGAGATTGCCAGCACCCCTCGTTGGA

GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAA
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTCCCTGGTACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCC
 CTAAAGAGTCAAGCATCTAA

(SEQ ID NO: 4)

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido soluble (extracelular) ActRIIB humano es la siguiente (la secuencia que se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una arginina en su lugar):

GGCGTGGGGAGGGCTGAGACACGGAGTGCATCTACTACAACGCCA
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCAGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGCCAACAGCTCTGGC
 ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
 ACGATAAGGCAGGAGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCA
 GAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCA
 CC

10

(SEQ ID NO: 5)

- La invención se refiere a polipéptidos de la trampa de GDF que son formas variantes de polipéptidos ActRIIB solubles. Como se describe en este documento, el término "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere generalmente a polipéptidos 15 que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. El término "polipéptido ActRIIB soluble", como se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de la misma (incluidos mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y generalmente es soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles incluyen polipéptidos solubles ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID 20 NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). Otro ejemplo de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, véase el ejemplo 1. La secuencia señal puede ser una secuencia señal nativa de un ActRIIB, o una secuencia señal de otra proteína, tal como una secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (TPA) o una secuencia señal de la melitinina de abeja melífera (HBM).

- 25 La descripción identifica porciones y variantes funcionalmente activas de ActRIIB. Los solicitantes han comprobado que una proteína Fc que tiene la secuencia descrita por Hilden y col. (Blood. 1994, 15 de abril; 83 (8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la SEQ ID NO: 1 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por la activina y el GDF-11. Por el contrario, la misma proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y el GDF-11 en el intervalo de bajo nanomolar a alto picomolar. 30 Por lo tanto, en esta descripción se utiliza una secuencia con un R64 como la secuencia de referencia de tipo natural para ActRIIB humano.

Attisano y col. (Cell. 1992, 10 de enero; 68 (1):97-108) mostraron que una delección del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB reducía la afinidad del receptor por la activina. Una proteína de fusión ActRIIB

que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 1, "ActRIIB (20-119)-Fc", ha reducido la unión a GDF-11 y la activina en relación con un ActRIIB (20-134)-Fc, que incluye la región del nudo de prolina y el dominio yuxtamembrana completo. Sin embargo, una proteína ActRIIB (20-129)-Fc conserva una actividad similar pero algo reducida relativa al tipo natural, incluso aunque la región del nudo de prolina esté interrumpida. Por lo tanto, se espera que los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 estén activos, pero las construcciones que se detienen en 134 o 133 pueden ser las más activas. De manera similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los restos 129-134 alteren la afinidad de unión a ligando por márgenes grandes. En apoyo de esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, un polipéptido de la trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión reducida al ligando. El aminoácido 119 está mal conservado y, por lo tanto, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o más tarde conservan la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Cualquiera de estas formas puede ser deseable de usar, dependiendo del entorno clínico o experimental.

15

En el extremo N de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes conserve la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial.

Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación unida a N sin afectar sustancialmente la unión al ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión de señal y la región entrecruzada de cisteína, correspondientes a los aminoácidos 20-29 son bien toleradas. En particular, las construcciones que comienzan en las posiciones 20, 21, 22, 23 y 24 conservarán la actividad, y las construcciones que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 también se espera que conserven la actividad. Los datos que se muestran en los ejemplos demuestran que, sorprendentemente, una construcción que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, y las construcciones de las trampas de GDF pueden, por ejemplo, comprender una porción de ActRIIB que comienza en un resto correspondiente a los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que finaliza en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición del 20-29 o 21-29 y finalizan en una posición del 119-134, 119-133, 129-134, o 129-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición de 20-24 (o 21-24, o 22-25) y finalizan en una posición de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de la SEQ ID NO: 1 o 39. También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, particularmente aquellos que tengan al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 1 o 39. En determinados casos, el polipéptido de la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los restos de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1 o 39. En determinados casos, el polipéptido de la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente, o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. En casos preferidos, el polipéptido de la trampa de GDF consiste, o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38.

La descripción incluye los resultados de un análisis de las estructuras compuestas de ActRIIB, que se muestran en la figura 1, demostrando que el bolsillo de unión al ligando está definido por los restos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101. En estas posiciones se espera que se toleren mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que las R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es una K en Xenopus, lo que indica que se tolerarán bien aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de Xenopus y, por lo tanto, los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H se tolerarán bien en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para una proteína de la trampa de GDF es una que comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, pero que opcionalmente comienza en una posición que oscila entre 20-24 o 22-25 y que finaliza en una posición que oscila entre 129-134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservativos de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 en el bolsillo de unión al ligando. Dicha proteína puede conservar más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se señaló anteriormente) y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) realmente mejora la unión al ligando en la A64 original, y por lo tanto se espera que no tenga ningún efecto perjudicial sobre la unión al ligando en la R64 original. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 de la A64 original, demostrando así que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio

R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por tanto, otro resto básico, tal como H, se puede tolerar bien en la posición 64.

ActRIIB está bien conservado en casi todos los vertebrados, con grandes extensiones del dominio extracelular conservadas por completo. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están altamente conservados. En consecuencia, las comparaciones de secuencias ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan información sobre los restos que pueden alterarse. Por lo tanto, un polipéptido activo ActRIIB variante humano útil como una trampa de GDF puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIB de vertebrado, o puede incluir un resto que sea similar al de la secuencia humana u otra secuencia de vertebrados. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIB. L46 es una valina en *Xenopus* ActRIIB, por lo que esta posición se puede alterar, y opcionalmente se puede alterar a otro resto hidrófobo, tal como V, I o F, o un resto no polar tal como A. E52 es un K en *Xenopus*, lo que indica que este sitio puede tolerar una gran diversidad de cambios, incluidos los restos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es un K en *Xenopus*, lo que indica que una amplia variación estructural es tolerada en esta posición, con restos polares favorecidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es una Y en *Xenopus* y, por lo tanto, Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L, deben ser tolerados. E111 es K en *Xenopus*, lo que indica que los restos cargados se tolerarán en esta posición, incluidos D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que los restos básicos se toleran en esta posición, incluidos R y H. A en la posición 119 están relativamente mal conservados y aparecen como P en roedores y V en *Xenopus*, por tanto, cualquier aminoácido debería ser tolerado en esta posición.

La descripción demuestra que la adición de un sitio de glicosilación unido a N adicional (NXS/T) aumenta la semivida en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB (R64)-Fc. Al introducir una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia NXT que puede conferir una semivida más larga. Otras secuencias NX (T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no estar eficazmente glicosilada con la R en la posición 64. Las secuencias NXS/T generalmente se pueden introducir en las posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definido en la figura 1. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias NXS/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el enlazador entre la secuencia ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Tal sitio se puede introducir con un esfuerzo mínimo mediante la introducción de una N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistentes o mediante la introducción de una S o T en una posición correspondiente a una N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación unido a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se prevea que va a ser glicosilada se puede alterar a una T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección otorgada por la glicosilación. Asimismo, cualquier T que se prevea que va a ser glicosilada se puede alterar a una S. Por tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Asimismo, en una variante A24N se puede usar una alteración S26T. En consecuencia, una trampa de GDF puede ser una variante de ActRIIB que tiene una o más secuencias de consenso de glicosilación unidas a N no endógenas adicionales.

40 La posición L79 de ActRIIB puede alterarse para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79P reduce la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D conserva la unión a GDF-11. Sorprendentemente, las variantes L79E y L79D han reducido considerablemente la unión de activina. Los experimentos *in vivo* indican que estos receptores no activina conservan una capacidad significativa para aumentar los glóbulos rojos, pero muestran efectos reducidos en otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y la 45 viabilidad de obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina. En casos ejemplares, los procedimientos descritos en este documento utilizan un polipéptido de la trampa de GDF que es un polipéptido variante ActRIIB que comprende un aminoácido ácido (por ejemplo, D o E) en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos adicionales.

50 Las variaciones descritas pueden combinarse de diversas maneras. Además, los resultados del programa de mutagénesis descrito en este documento indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que a menudo son beneficiosas para conservar. Estos incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo y particularmente el triptófano), la posición 37 (ácido y particularmente el ácido 55 aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente la fenilalanina o la tirosina). Por lo tanto, en cada una de las variantes descritas en este documento, la descripción proporciona un marco de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que pueden ser deseables para conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargada, particularmente E, D, R o K).

60 En determinados casos, pueden obtenerse fragmentos aislados de polipéptidos ActRIIB seleccionando polipéptidos

producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y 5). Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como la química f-Moc o t-Boc convencional en fase sólida de Merrifield. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o por síntesis química) y probarse para identificar aquellos 5 fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando ActRIIB.

En determinados casos, el polipéptido de la trampa de GDF es un polipéptido variante ActRIIB que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID 10 NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. En determinados casos, la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de amino 15 seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. En determinados casos, la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente, o consiste en, una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID 15 NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41, en la que la posición correspondiente a L79 de la SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido (por ejemplo, un resto de aminoácido D o E).

En determinados casos, la presente descripción contempla fabricar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido de la trampa de GDF para fines tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, 20 vida útil *ex vivo* y la resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). También pueden producirse polipéptidos de la trampa de GDF por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente (por ejemplo, 25 mutaciones conservadoras) no tendrán un efecto importante en la actividad biológica que una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si bien, un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la trampa de GDF resulta en una variante funcional, puede determinarse fácilmente mediante la evaluación de la capacidad del polipéptido de la trampa GDF para producir una respuesta en las células en relación con el polipéptido de la trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo natural, o para unir uno o más ligandos, tales 30 como la activina, el GDF-11 o la miostatina en comparación con el polipéptido de la trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo natural.

En determinados casos específicos, la presente descripción contempla fabricar mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB de modo que el polipéptido ActRIIB tenga actividades de unión a ligando alteradas (por ejemplo, afinidad de unión o especificidad de unión). En determinados 35 casos, tales polipéptidos de la trampa de GDF tienen afinidad de unión alterada (elevada o reducida) para un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos de la trampa de GDF han alterado la especificidad de unión para los ligandos ActRIIB.

Por ejemplo, la descripción proporciona polipéptidos de la trampa de GDF que se unen preferentemente a 40 GDF8/GDF11 en relación con activinas. La descripción establece además la conveniencia de que tales polipéptidos reduzcan los efectos colaterales, aunque tales variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves en las que pueden ser necesarias grandes ganancias en los niveles de glóbulos rojos para el efecto terapéutico y en las que algún nivel del efecto colateral es aceptable. Por ejemplo, los restos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, tal como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, se encuentran en el bolsillo de unión al ligando 45 y median la unión a sus ligandos, tales como la activina y el GDF8. Por lo tanto, la presente descripción proporciona una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, el dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en esos restos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad incrementada para un ligando tal como GDF8 en relación con un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones 50 aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF8 sobre activina. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una relación de K_{dI} para la unión de activina a la K_d para la unión de GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con la relación para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una relación de C_{I50} para la inhibición de activina a la C_{I50} para la inhibición de GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio 55 de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe GDF8 con una C_{I50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la C_{I50} para la inhibición de activina.

Como ejemplo específico, el resto de aminoácido con carga positiva Asp (D80) del dominio de unión al ligando de ActRIIB puede mutarse a un resto de aminoácido diferente para producir un polipéptido de la trampa de GDF que se 60 une preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferentemente, el resto D80 se cambia a un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en: un resto de aminoácido no cargado, un resto de aminoácido negativo

y un resto de aminoácido hidrófobo. Como ejemplo específico adicional, el resto hidrófobo L79 se puede alterar a los aminoácidos ácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión a activina a la vez que se conserva la unión a GDF11. Como reconocerá un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas se pueden realizar a nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, por modificación postraduccional o síntesis química. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica.

- En determinados casos, la presente descripción contempla polipéptidos de la trampa de GDF que tienen mutaciones específicas en ActRIIB para alterar la glicosilación del polipéptido ActRIIB. Los sitios de glicosilación ejemplares en polipéptidos de la trampa de GDF se ilustran en la figura 1 (por ejemplo, los sitios NX (S/T) subrayados). Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como los sitios de glicosilación unidos a O o unidos a N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (en la que "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por las enzimas de glicosilación celular adecuadas. La alteración también se puede realizar mediante la adición o la sustitución de uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo natural (para los sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posición de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado una no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en un polipéptido de la trampa de GDF es mediante el acoplamiento químico o enzimático de los glicósidos al polipéptido de la trampa de GDF. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el(es) azúcar(es) se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306. La eliminación de uno o más restos de carbohidratos presentes en un polipéptido de la trampa de GDF se puede realizar químicamente y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de la trampa de GDF al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja la secuencia de aminoácidos intacta. La desglicosilación química se describe con más detalle por Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y en Edge y col. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de los restos de carbohidratos en polipéptidos de la trampa de GDF se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo y exo-glicosidasas como lo describen Thotakura y col. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido de la trampa de GDF puede ajustarse, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos de la trampa de GDF para su uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glicosilación adecuada, tales como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que sean útiles otras líneas celulares de expresión de mamíferos.
- Esta descripción contempla además un procedimiento para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido de la trampa de GDF, que incluyen, opcionalmente, variantes de truncamiento; los conjuntos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de trampas de GDF. El objetivo de seleccionar tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos de la trampa de GDF que tengan propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada, o unión al ligando alterada.
- A continuación se proporciona una diversidad de ensayos de selección, y tales ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido de la trampa de GDF puede seleccionarse para determinar la capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIB, para impedir la unión de un ligando ActRIIB a un polipéptido ActRIIB o para interferir con la señalización causada por un ligando ActRIIB.
- La actividad de un polipéptido de la trampa de GDF o sus variantes también se puede probar en un ensayo basado en células *in vivo*. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido de la trampa de GDF sobre la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Según sea necesario, esto puede realizarse en presencia de una o más proteínas ligando ActRIIB recombinantes (por ejemplo, activina), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido de la trampa de GDF y/o variantes de las mismas, y opcionalmente, un ligando ActRIIB. Del mismo modo, se puede administrar un polipéptido de la trampa de GDF a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más mediciones de sangre, tal como un recuento de eritrocitos, niveles de hemoglobina, niveles de hematocrito, reservas de hierro o recuento de reticulocitos utilizando procedimientos reconocidos en la técnica.

Pueden generarse variantes derivadas de manera combinatoria que tienen una potencia selectiva en relación con un polipéptido de la trampa de GDF de referencia. Tales proteínas variantes, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Del mismo modo, la

mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares considerablemente diferentes a las del polipéptido de la trampa de GDF no modificado correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procedimientos que dan como resultado la destrucción o de otra manera la inactivación de un polipéptido de la trampa de GDF no modificado. Tales variantes, y los genes 5 que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptidos de la trampa de GDF mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos de la trampa de GDF. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptidos de la trampa de GDF recombinante dentro de la célula. En una 10 proteína de fusión Fc, se pueden realizar mutaciones en el enlazador (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF de la descripción pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos ActRIIB. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, 15 lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de la trampa de GDF pueden contener elementos no aminoacídicos, tales como polielenglicoles, lípidos, poli o mono-sacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos no aminoacídicos en la funcionalidad de un polipéptido de la trampa de GDF pueden probarse como se describe en este documento para otras variantes de polipéptidos de la trampa de GDF. Cuando se produce un polipéptido de la trampa de GDF en las células al escindir una forma naciente del polipéptido de la trampa de GDF, el procesamiento 20 postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos de la trampa de GDF.

25 En determinados aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de un polipéptido ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, una Fc), maltosa proteína de unión (MBP), o albúmina de suero humano. Se puede seleccionar un dominio de fusión de tal forma que confiera una 30 propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son especialmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el objetivo de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como las resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de estas matrices están en forma de "kit", tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen), útil con parejas de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un 35 dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de la trampa de GDF. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como las "etiquetas de epítopos", que suelen ser secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítopo bien conocidas para las cuales los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un 40 sitio de escisión para proteasas, tal como para el factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por consiguiente, libere de ahí las proteínas recombinantes. Las proteínas liberadas se pueden aislar luego del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En determinados casos preferidos, un polipéptido de la trampa de GDF se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido de la trampa de GDF *in vivo* (un "dominio estabilizador"). Por "estabilización" se entiende cualquier cosa que aumente la 45 semivida en suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, una disminución del aclaramiento del riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren las propiedades farmacocinéticas deseadas a un amplio intervalo de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios 50 funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como un aumento adicional de los niveles de glóbulos rojos).

Como ejemplo específico, la presente descripción proporciona una trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, unión a ligando) del polipéptido ActRIIB fusionado a 55 un dominio Fc. La secuencia de un dominio Fc ejemplar se muestra a continuación (SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAK
 GQPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

Opcionalmente, el dominio Lc tiene una o más mutaciones en restos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En determinados casos, el dominio Lc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fc en relación con un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene una capacidad incrementada de unión al receptor Fc relacionado con la clase I del MHC (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo natural.

- 10 Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden disponerse de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF puede colocarse en el C-terminal a un dominio heterólogo, o, como alternativa, un dominio heterólogo puede colocarse en el C-terminal de un polipéptido de la trampa de GDF. El dominio del polipéptido de la trampa de GDF y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y los dominios adicionales o secuencias de aminoácidos pueden incluirse 15 en el C o N terminal en cualquiera de los dominios o entre los dominios.

En determinados casos, una proteína de fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula ABC. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado en el extremo N y C que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26. Las porciones A y C 20 pueden ser independientemente cero, una o más de un aminoacido, y ambas porciones A y B son heterólogas a B. Las porciones A y/o C pueden unirse a la porción B mediante una secuencia enlazadora. Los enlazadores ejemplares incluyen enlazadores polipeptídicos cortos tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 restos de glicina, tales como, por ejemplo, un enlazador Gli-Gli-Gli. Otros enlazadores adecuados se describen en este documento anteriormente. En determinados casos, una proteína de fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se 25 establece en la fórmula ABC, en la que A es una secuencia líder, B consiste en los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26, y C es una porción de polipéptido que mejora una o más de una estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos de proteínas, y/o purificación. En determinados casos, una proteína de fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como 30 se establece en la fórmula ABC, en la que A es una secuencia líder de TPA, B consiste en los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26, y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión de la trampa de GDF preferida comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 26.

En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF de la presente descripción contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de la trampa de GDF. Por ejemplo, tales modificaciones 35 mejoran la semivida *in vitro* de los polipéptidos de la trampa de GDF, mejoran la semivida circulante de los polipéptidos de la trampa de GDF o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de la trampa de GDF. Tales modificaciones de estabilización incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de la trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluyen, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de la 40 trampa de GDF), y modificaciones del resto de carbohidrato (que incluye, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidrato de un polipéptido de la trampa de GDF). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido de la trampa de GDF se fusiona con un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en este documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas tales como un 45 resto carbohidrato o un polímero no proteináceo tal como polietilenglicol.

En determinados casos, la presente descripción pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de la trampa de GDF, que se aislan de otras proteínas o, de otra manera, están sustancialmente libres de otras proteínas.

50 En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF (no modificados o modificados) de la descripción pueden producirse mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos de la trampa de GDF se pueden sintetizar utilizando técnicas estándar de química de proteínas tales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant GA (ed.), Synthetic Peptides: A

User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, los sintetizadores automáticos de péptidos están disponibles en el mercado (por ejemplo, Advanced ChemTech Model 396); Milligen/Bioscience 9600). Como alternativa, los polipéptidos de la trampa de GDF, fragmentos o variantes de los mismos pueden producirse de forma recombinante utilizando diversos sistemas de expresión (por ejemplo, *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus) como es bien conocido en la técnica. En un caso adicional, los polipéptidos de la trampa de GDF modificados o no modificados pueden producirse por digestión de polipéptidos de la trampa de GDF de longitud completa producidos de forma recombinante utilizando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima convertidora de aminoácido básico pareado (PACE). El análisis computarizado (utilizando un software disponible en el mercado, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular 5 Simulation, Inc.) se puede usar para identificar los sitios de escisión proteolítica. Como alternativa, tales polipéptidos de la trampa de GDF pueden producirse a partir de polipéptidos de la trampa de GDF de longitud completa tales como las técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como por escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

15 3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la trampa de GDF

En determinados aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos de la trampa de GDF descritos en este documento. La SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 5 codifica un polipéptido de ActRIIB soluble, y las SEQ ID NO: 25, 27, 30 y 31 codifican las trampas de GDF solubles. Los ácidos nucleicos objetivo pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para preparar polipéptidos de la trampa de GDF o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

25 En determinados aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos objetivo que codifican los polipéptidos de la trampa de GDF incluyen ácidos nucleicos que son variantes de las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o 30 deletiones, tales como variantes alélicas; y, por lo tanto, incluirá secuencias de codificación que difieran de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación designada en las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31.

30 En determinados casos, la descripción proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31. Un experto en la materia apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, y las variantes de la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, también están dentro del alcance de esta descripción, en 35 casos adicionales, las secuencias de ácido nucleico de la descripción pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

En otros casos, los ácidos nucleicos de la descripción también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, la 40 secuencia de complemento de la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, o fragmentos de las mismas. Como se explicó anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, uno podría realizar la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de entre una baja rigurosidad de aproximadamente 45 2,0 x SSC a 50 °C y una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En un caso, la descripción proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x 50 SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se establece en la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, varios aminoácidos son designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o 55 sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden producir mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. En determinados casos, el polipéptido de la trampa de GDF se codificará mediante una secuencia de nucleótidos alternativa. Las secuencias de nucleótidos alternativas están degeneradas con respecto a la secuencia de ácido nucleico de la trampa de GDF nativa pero todavía codifican la misma proteína de fusión. En determinados casos, la trampa de GDF que tiene la SEQ ID NO: 26 está codificada por 60 una secuencia de ácido nucleico alternativa que comprende la SEQ ID NO: 30. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas

objetivo entre las células de mamíferos. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una determinada especie debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas estas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de 5 esta descripción.

En determinados casos, los ácidos nucleicos recombinantes de la descripción pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Generalmente, las secuencias de nucleótidos reguladoras serán adecuadas para la célula huésped usada para la expresión. En la técnica se conocen 10 diversos tipos de vectores de expresión adecuados y secuencias reguladoras adecuadas para una diversidad de células huésped. Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de promotores, secuencias líder o señal, sitios de unión de ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o secuencias activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles tal y como se conocen en la técnica se contemplan 15 en la descripción. Los promotores pueden ser promotores presentes de forma natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede estar insertada en un cromosoma. En un caso preferido, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y varían en función 20 de la célula huésped usada.

En determinados aspectos de la descripción, el ácido nucleico objetivo se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la trampa de GDF y está unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan 25 para dirigir la expresión del polipéptido de la trampa de GDF. En consecuencia, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Las secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella puede usarse en estos vectores para 30 expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de la trampa de GDF. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos del SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, las regiones operadoras y promotoras principales del fago lambda, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-35 fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores α de apareamiento de la levadura, el promotor de poliedros del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de células procariotas y eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. 40 Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como los marcadores de antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante de la descripción puede producirse uniendo el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucarióticas (levadura, aviar, insecto o 45 mamífero), o ambos. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de la trampa de GDF recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procarióticas, tales como E. coli.

50 Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias y una o más unidades de transcripción eucarióticas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias procedentes de plásmidos bacterianos, tales 55 como pBR322, para facilitar la replicación y selección de la resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en eucariotas. Como alternativa, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Más adelante, en la descripción de los sistemas de suministro de terapia génica se pueden encontrar ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales). Los diversos procedimientos empleados en 60 la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como para procedimientos generales

recombinantes, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2^a ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión en baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión en baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), 5 vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene β-gal).

En un caso preferido, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, California), vectores pcDNA4 (Invitrogen, 10 Carlsbad, California) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, las construcciones génicas objetivo se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

15 Esta descripción también se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 o 31) para uno o más de los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF de la descripción puede expresarse en células bacterianas tales como E. coli, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamíferos. Los 20 expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

En consecuencia, la presente descripción se refiere además a procedimientos para producir los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de la trampa de GDF puede cultivarse en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la 25 expresión del polipéptido de la trampa de GDF. El polipéptido de la trampa de GDF puede secretarse y aislar de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de la trampa de GDF. Como alternativa, el polipéptido de la trampa de GDF puede conservarse citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células se recolectan, se lisán y la proteína se aísla. Un cultivo celular incluye células huésped, medio y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo se 30 pueden aislar del medio de cultivo celular, células huésped o ambos utilizando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunofijación con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de la trampa de GDF. En un caso preferido, el polipéptido de la trampa de GDF es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

35 En otro caso, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo N de la porción deseada del polipéptido de la trampa de GDF recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad utilizando una resina del ión metálico Ni²⁺. A continuación, la secuencia líder de purificación se puede eliminar posteriormente 40 mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido de la trampa de GDF purificado (por ejemplo, Hochuli y col., (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht y col., *PNAS USA* 88:8972).

Las técnicas de fabricación de genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican para diferentes secuencias polipeptídicas se puede llevar a cabo conforme a técnicas 45 convencionales, empleando extremos romos o escalonados para ligamiento, digestión con enzima de restricción para proporcionar extremos adecuados, relleno de extremos cohesivos según convenga, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y unión enzimática. En otro caso, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes 50 complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos para generar una secuencia de genes químicos (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

4. Ensayos de selección

55 En determinados aspectos, la presente descripción se refiere al uso de los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB variantes solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados a través de esta selección pueden analizarse para evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos 60 compuestos se pueden probar, por ejemplo, en modelos animales.

Existen numerosos enfoques para la selección de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de hemoglobina o glóbulos rojos dirigidos a la señalización de ActRIIB. En determinados casos, se puede llevar a cabo una selección de compuestos de alto rendimiento para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB en una línea celular seleccionada. En determinados casos, el ensayo se lleva a cabo para detectar e identificar compuestos que inhiban o reduzcan específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Como alternativa, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando ActRIIB. En un caso adicional, los compuestos pueden identificarse por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Una diversidad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente descripción, los no descritos expresamente en este documento, sin embargo, los comprenderá un experto en la materia. Como se describe en este documento, los compuestos de ensayo (agentes) de la descripción pueden crearse mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. Como alternativa, los compuestos objetivo pueden ser biomoléculas naturales sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se van a analizar por su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento del tejido pueden producirse, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos los peptidomiméticos) o producidos de forma recombinante. Los compuestos de ensayo contemplados por la presente descripción incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En un caso específico, el agente de ensayo es una pequeña molécula orgánica que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 Dalton.

Los compuestos de ensayo de la descripción pueden proporcionarse como entidades individuales, discretas, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tal como se hace mediante química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros alquílicos, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo en los sistemas de ensayo puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de selección iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y tener grupos de derivación que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitativos de grupos de derivación incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes reticulantes fotoactivantes o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de selección de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, los ensayos de alto rendimiento son deseables para maximizar el número de compuestos estudiados en un período de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como los que pueden derivarse de proteínas purificadas o semi-purificadas, a menudo se prefieren como pantallas "primarias" porque pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en un objetivo molecular que está mediado por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de ensayo pueden ignorarse en general en el sistema *in vitro* centrándose el ensayo en su lugar principalmente en el efecto del fármaco en el objetivo molecular, como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su pareja de unión (por ejemplo, un ligando ActRIIB).

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de selección ejemplar de la presente descripción, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que habitualmente es capaz de unirse a un ligando ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. A la mezcla del compuesto y polipéptido ActRIIB se le añade luego una composición que contiene un ligando ActRIIB. La detección y cuantificación de los complejos de ligandos ActRIIB/ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de respuesta de la dosis a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, se puede realizar también un ensayo de control para proporcionar un valor inicial comparativo. Por ejemplo, en un ensayo de control, el ligando ActRIIB aislado y purificado se añade a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y la formación del complejo del ligando ActRIIB/ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, se puede modificar el orden en que se pueden mezclar los reactivos y que estos se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para conseguir un sistema de ensayo libre de células.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una diversidad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como polipéptidos ActRIIB marcados radiactivamente (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C o ³H), marcados fluorescentemente (por ejemplo, FITC) o marcados enzimáticamente, mediante

inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

- En determinados casos, la presente descripción contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y la patente estadounidense n.º 5.677.196), resonancia por plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchos casos descritos de la descripción.
- 10 Además, la presente descripción contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su pareja de unión. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.283.317; Zervos y col. (1993) Cell 72:223-232; Madura y col. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel y col. (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi y col. (1993) Oncogene 8:1693-1696). En un caso específico, la presente descripción contempla el uso de 15 dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo moléculas pequeñas o péptidos) que disocian interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81 y las patentes estadounidenses n.º 5.525.490; 5.955.280 y 5.965.368.
- 20 En determinados casos, los compuestos objetivo se identifican por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción puede identificarse a nivel de proteínas utilizando procedimientos bioquímicos *in vitro*, que incluyen el reticulado, la unión al ligando radiomarcado y la cromatografía de afinidad (Jakoby WB y col., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En determinados casos, los compuestos pueden seleccionarse en un ensayo basado en un 25 mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Este puede incluir un evento de unión en fase sólida o en fase fluida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB puede transfectarse con un sistema reportador (por ejemplo, β-galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y analizarse contra la biblioteca, preferentemente mediante una selección de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos de acción, 30 por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con el objetivo fijado a un pocillo, perla o chip, capturado mediante un anticuerpo inmovilizado o se pueden resolver mediante electroforesis capilar. Generalmente, los compuestos unidos se pueden detectar usando resonancia colorimétrica, de fluorescencia o por plasmones superficiales.

35 5. Usos terapéuticos ejemplares

En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF de la presente descripción se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates, y particularmente en pacientes humanos. Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de EPO, 40 pueden ser útiles para tratar la eritropoyesis inefectiva. Originalmente distinguida de la anemia aplásica, hemorragia o hemólisis periférica sobre la base de estudios ferroquinéticos (Ricketts y col., 1978, Clin Nucl Med 3: 159-164), la eritropoyesis inefectiva describe un grupo diverso de anemias en las cuales la producción de RBC maduros es menos de lo que se esperaría dado el número de precursores eritroides (eritroblastos) presentes en la médula ósea (Tanno y col., 2010, Adv Hematol 2010: 358283). En tales anemias, la hipoxia tisular persiste a pesar de los niveles elevados 45 de eritropoyetina debido a la producción ineficaz de glóbulos rojos maduros. Con el tiempo, se desarrolla un círculo vicioso en el que los niveles elevados de eritropoyetina conducen a la expansión masiva de los eritroblastos, lo que potencialmente conduce a la esplenomegalia (agrandamiento del bazo) debido a la eritropoyesis extramedular (Aizawa y col., 2003, Am J Hematol 74: 68-72), patología ósea inducida por eritroblastos (Di Matteo y col., 2008, J Biol Regul Homeost Agents 22:211-216), y sobrecarga de hierro tisular, incluso en ausencia de transfusiones terapéuticas de 50 RBC (Pippard y col., 1979, Fancet 2:819-821). Por lo tanto, al potenciar la efectividad eritropoyética, un polipéptido de la trampa de GDF puede romper el ciclo mencionado anteriormente y puede aliviar no solo la anemia subyacente sino también las complicaciones asociadas de los niveles elevados de eritropoyetina, esplenomegalia, patología ósea y sobrecarga de hierro en los tejidos. Los polipéptidos de la trampa de GDF pueden tratar la eritropoyesis inefectiva, incluida la anemia y los niveles elevados de EPO, así como las complicaciones tales como la esplenomegalia, la 55 patología ósea inducida por eritroblastos, la sobrecarga de hierro y sus patologías asociadas. Con la esplenomegalia, tales patologías incluyen dolor torácico o abdominal e hiperplasia reticulendoendotelial. La hematopoyesis extramedular puede producirse no solo en el bazo sino potencialmente en otros tejidos en forma de pseudotumores hematopoyéticos extramedulares (Musallam y col., 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). Con la patología ósea inducida por eritroblastos, las patologías asociadas incluyen baja densidad mineral ósea, osteoporosis y dolor óseo (Haidar y col., 2011, Bone 48:425-432). Con la sobrecarga de hierro, las patologías asociadas incluyen la supresión de hepcidina y la hiperabsorción de hierro en la dieta (Musallam y col., 2012, Blood Rev 26 (Suppl 1):S16-S19), endocrinopatías 60

múltiples y fibrosis hepática/cirrosis (Galanello y col., 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), y la cardiomielopatía por sobrecarga de hierro (Lekawanyit y col., 2009, Can J Cardiol 25: 213-218).

- Las causas más comunes de eritropoyesis inefectiva son los síndromes de talasemia, hemoglobinopatías hereditarias en las cuales los desequilibrios en la producción de cadenas de alfa y hemoglobina intactas conducen a un aumento de la apoptosis durante la maduración del eritroblasto (Schrier, 2002, Curr Opin Hematol 9:123-126). Las talasemias se encuentran colectivamente entre los trastornos genéticos más frecuentes en todo el mundo, y se espera que los patrones epidemiológicos cambiantes contribuyan a un creciente problema de salud pública en los EE. UU. y en todo el mundo (Vichinsky, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:18-24). Los síndromes de talasemia se nombran según su gravedad. Por lo tanto, las α-talasemias incluyen α-talasemia menor (también conocida como rasgo de α-talasemia; dos genes de α-globina afectados), enfermedad de hemoglobina H (tres genes de α-globina afectada) y α-talasemia mayor (también conocida como hidropesía fetal; cuatro genes de α-globina afectados). Las β-talasemias incluyen β-talasemia menor (también conocida como rasgo de β-talasemia; un gen de β-globina afectado), β-talasemia intermedia (dos genes de β-globina afectados), talasemia de hemoglobina E (dos genes de β-globina afectados), y β-talasemia mayor (también conocida como anemia de Cooley; dos genes de β-globina afectados que resultan en una ausencia completa de la proteína β-globina). La β-talasemia afecta a múltiples órganos, se asocia con una considerable morbilidad y mortalidad, y actualmente requiere atención de por vida. Aunque la esperanza de vida en pacientes con β-talasemia ha aumentado en los últimos años debido al uso de transfusiones regulares de sangre junto con quelación de hierro, la sobrecarga de hierro resultante de las transfusiones y de la excesiva absorción de hierro gastrointestinal puede causar graves complicaciones tales como, cardiopatías, trombosis, hipogonadismo, hipotiroidismo, diabetes, osteoporosis y osteopenia (Rund y col, 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). Como se demuestra en este documento con un modelo de ratón de la β-talasemia, se puede usar un polipéptido de la trampa de GDF, opcionalmente combinado con un activador del receptor de EPO, para tratar los síndromes de talasemia.
- Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de EPO, se pueden usar para tratar los trastornos de la eritropoyesis inefectiva además de síndromes de talasemia. Dichos trastornos incluyen anemia sideroblástica (hereditaria o adquirida); anemia diseritropoyética (tipos I y II); anemia falciforme; esferocitosis hereditaria; deficiencia de piruvato quinasa; anemias megaloblásticas, potencialmente causadas por afecciones tales como la deficiencia de folato (debido a enfermedades congénitas, disminución de la ingesta o aumento de los requisitos), deficiencia de cobalamina (debida a enfermedades congénitas, anemia perniciosa, absorción deficiente, insuficiencia pancreática o disminución de la ingesta), determinados fármacos, o causas inexplicables (anemia diseritropoyética congénito, anemia megaloblástica refractaria o eritroleucemia); anemias mielofisicas, incluyendo mielofibrosis (metaplasia mieloide) y mielofisosis; porfiria eritropoyética congénita; y envenenamiento por plomo.
- Como se usa en este documento, un agente terapéutico que “impide” un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control no tratada. El término “tratar” como se usa en este documento incluye la mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento se pueden discernir en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro asistente sanitario y el resultado previsto de la administración del agente terapéutico.
- Como se muestra en este documento, los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y dichos polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en poblaciones de pacientes seleccionadas. Los ejemplos de poblaciones de pacientes adecuadas incluyen aquellos con niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como los pacientes con anemia, y aquellos con riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tal como aquellos pacientes que están a punto de someterse a cirugía mayor u otros procedimientos que pueden resultar en una pérdida sustancial de sangre. En un caso, un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos se trata con un polipéptido de la trampa de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos, y luego se extrae sangre y se almacena para su uso posterior en transfusiones.
- Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de EPO, descritos en este documento pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen una anemia. Cuando se observan niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel inferior a lo normal para la categoría adecuada de edad y género puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl generalmente se considera el límite inferior de lo normal en la población adulta general. Las posibles causas incluyen pérdida de sangre, deficiencias nutricionales, reacciones a los medicamentos, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se

ha asociado con una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada con las siguientes afecciones: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon); tumores del sistema linfático (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfomas no Hodgkins y Hodgkins); tumores del sistema hematopoyético (por ejemplo, leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); terapia de radiación; quimioterapia (por ejemplo, regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunes, que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enfermedad renal aguda o crónica o insuficiencia que incluye afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; hemorragia aguda o crónica; situaciones en las que la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a los autoanticuerpos del paciente y/o por razones religiosas (por ejemplo, algunos testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemias; uso o abuso de drogas, por ejemplo, abuso de alcohol; pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar transfusiones; y pacientes ancianos o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones por sobrecarga circulatoria.

El síndrome mielodisplásico (SMD) es una colección diversa de afecciones hematológicas caracterizadas por la producción ineficaz de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación a leucemia mielógena aguda. En los pacientes con SMD, las células madre sanguíneas no maduran y se convierten en glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas saludables. Los trastornos de SMD incluyen, por ejemplo, anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, citopenia refractaria con displasia multilinaje y síndrome mielodisplásico asociado con una anomalía aislada de cromosoma 5q. Dado que estos trastornos se manifiestan como defectos irreversibles tanto en cantidad como en calidad de las células hematopoyéticas, la mayoría de los pacientes con SMD padecen anemia crónica. Por lo tanto, los pacientes con SMD con el tiempo requieren transfusiones de sangre y/o tratamiento con factores de crecimiento (por ejemplo, eritropoyetina o G-CSF) para aumentar los niveles de glóbulos rojos. Sin embargo, muchos pacientes con SMD desarrollan efectos secundarios debido a la frecuencia de tales terapias. Por ejemplo, los pacientes que reciben transfusiones frecuentes de glóbulos rojos pueden sufrir daños en los tejidos y órganos debido a la acumulación de hierro adicional. Como se demuestra en los ejemplos a continuación, los polipéptidos de la trampa de GDF se utilizaron para tratar la anemia en un modelo de ratón del SMD. En consecuencia, los polipéptidos de la trampa de GDF descritos en este documento pueden usarse para tratar pacientes que tienen SMD. En determinados casos, los pacientes que sufren de SMD pueden tratarse utilizando una combinación de un polipéptido de la trampa de GDF en combinación con un activador del receptor de EPO. En otros casos, los pacientes que sufren de SMD pueden tratarse utilizando una combinación de un polipéptido de la trampa de GDF y uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar SMD incluyendo, por ejemplo, talidomida, lenalidomida, azacitadina, decitabina, eritropoyetinas, deferxamina, globulina antitimocítica, filgastrim (G-CSF) y un agonista de la vía de señalización de la eritropoyetina.

Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, serían adecuados para tratar las anemias de la médula ósea hipoproliferativa, que generalmente se asocian con un pequeño cambio en la morfología de los glóbulos rojos (RBC). Las anemias hipoproliferativas incluyen: 1) anemia por enfermedad crónica, 2) anemia por enfermedad renal y 3) anemia asociada con estados hipometabólicos. En cada uno de estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son inadecuadamente bajos para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen: 4) anemia deficiente de hierro en etapa temprana y 5) anemia causada por daño a la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena están adecuadamente elevados para el grado de anemia observado.

El tipo más común es la anemia por enfermedad crónica, que abarca inflamación, infección, lesión tisular y afecciones tales como el cáncer, y se distingue tanto por niveles bajos de eritropoyetina como por una respuesta inadecuada a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a edición; McGraw Hill, Nueva York, págs 628-634). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos están asociados con el procedimiento de la enfermedad en sí y con la generación de citoquinas inflamatorias tales como la interleucina 1, el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral (Bron y col., 2001, Semin Oncol 28 (Suppl 8):T-6). Entre sus efectos, la inflamación induce la hepcidina péptido regulador del hierro clave, inhibiendo así la exportación de hierro de los macrófagos y, en general, limitando la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400). La pérdida de sangre a través de diversas rutas también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de anemia debido a la progresión del cáncer varía según el tipo de cáncer, desde el 5 % en el cáncer de próstata hasta el 90 % en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer tiene profundas consecuencias para los pacientes, incluida la fatiga y la reducción de la calidad de vida, la reducción de la eficacia del tratamiento y el aumento de la mortalidad.

La enfermedad renal crónica se asocia con anemia hipoproliferativa que varía en gravedad con el grado de insuficiencia renal. Dicha anemia se debe principalmente a la producción inadecuada de eritropoyetina y a la reducción de la supervivencia de los glóbulos rojos. La enfermedad renal crónica por lo general avanza gradualmente durante un período de años o décadas a la enfermedad en etapa terminal (etapa 5), momento en el cual se requiere diálisis o trasplante de riñón para la supervivencia del paciente. La anemia a menudo se desarrolla temprano en este procedimiento y empeora a medida que avanza la enfermedad. Las consecuencias clínicas de la anemia de la enfermedad renal están bien documentadas e incluyen el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, función cognitiva alterada, calidad de vida reducida y función inmunitaria alterada (Levin y col., 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20 (Suppl 1):21-24; Revicki y col., 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter y col., 1994, Kidney Int 45:224-231). Como lo demuestran los solicitantes en un modelo de ratón de la enfermedad renal crónica (véase el ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de la trampa de GDF, opcionalmente combinado con un activador del receptor de EPO, para tratar la anemia de la enfermedad renal.

Muchas afecciones que resultan en una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa de leve a moderada. Entre tales afecciones se encuentran los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, la anemia puede producirse en la enfermedad de Addison, el hipotiroidismo, el hiperparatiroidismo o en los hombres castrados o tratados con estrógeno. La anemia de leve a moderada también puede producirse con una ingesta reducida de proteínas, una afección que prevalece especialmente en los ancianos. Finalmente, la anemia puede desarrollarse en pacientes con enfermedad hepática crónica que surgen de casi cualquier causa (Adamson, 2008, Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, Nueva York, pág 628-634).

La anemia que resulta de la pérdida de sangre aguda de un volumen suficiente, tal como un traumatismo o una hemorragia posparto, se conoce como anemia post-hemorrágica aguda. La pérdida de sangre aguda inicialmente causa hipovolemia sin anemia ya que hay un agotamiento proporcional de los RBC junto con otros componentes de la sangre. Sin embargo, la hipovolemia desencadenará rápidamente mecanismos fisiológicos que desplazan el fluido del compartimiento extravascular al vascular, lo que resulta en hemodilución y anemia. Si es crónica, la pérdida de sangre agota gradualmente las reservas corporales de hierro y con el tiempo conduce a una deficiencia de hierro. Como lo demuestran los solicitantes en un modelo de ratón (véase el ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de la trampa de GDF, opcionalmente combinado con un activador del receptor de EPO, para acelerar la recuperación de la anemia por pérdida de sangre aguda.

La anemia por deficiencia de hierro es la etapa final en una progresión gradual de la creciente deficiencia de hierro que incluye balance de hierro negativo y eritropoyesis deficiente de hierro como etapas intermedias. La deficiencia de hierro puede deberse a una mayor demanda de hierro, una menor ingesta de hierro o una mayor pérdida de hierro, como se exemplifica en condiciones como el embarazo, una dieta inadecuada, una mala absorción intestinal, una inflamación aguda o crónica y una pérdida de sangre aguda o crónica. Con una anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea permanece hipoproliferativa y la morfología de los RBC es en gran medida normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede dar lugar a algunos RBC hipocromáticos microcíticos, y la transición a una anemia severa con deficiencia de hierro se acompaña de una hiperproliferación de la médula ósea y RBC microcíticos e hipocrómicos cada vez más prevalentes (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, pág 628-634). La terapia adecuada para la anemia por deficiencia de hierro depende de su causa y gravedad, con las preparaciones orales de hierro, las formulaciones de hierro parenteral y la transfusión de RBC como las principales opciones convencionales. Un polipéptido de la trampa de GDF, opcionalmente combinado con un activador del receptor de EPO, podría usarse para tratar anemias crónicas con deficiencia de hierro sola o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

Las anemias hipoproliferativas pueden ser el resultado de una disfunción primaria o falla de la médula ósea, en lugar de una disfunción secundaria a una inflamación, infección o progresión del cáncer. Los ejemplos destacados serían la mielosupresión causada por los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer o la radioterapia contra el cáncer. Una amplia revisión de los ensayos clínicos descubrió que la anemia leve puede producirse en el 100 % de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que la anemia más grave puede producirse en hasta el 80 % de estos pacientes (Groopman y col., 1999, J Natl Cancer Inst 91:1616-1634). Los fármacos mielosupresores incluyen: 1) agentes alquilantes tales como las mostazas nitrogenadas (por ejemplo, melfalán) y nitrosoureas (por ejemplo, estreptozocina); 2) antimetabolitos tales como antagonistas del ácido fólico (por ejemplo, metotrexato), análogos de purina (por ejemplo, tioguanina) y análogos de pirimidina (por ejemplo, gemcitabina); 3) antibióticos citotóxicos tales como las antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina); 4) inhibidores de la quinasa (por ejemplo, gefitinib); 5) inhibidores mitóticos tales como taxanos (por ejemplo, paclitaxel) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinorelbina); 6) anticuerpos monoclonales (por ejemplo, rituximab); y 7) inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, topotecan y etopósido). Como se demuestra en un modelo de ratón de la anemia inducida por quimioterapia (véase el ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de la trampa de GDF, opcionalmente combinado con un activador del receptor de EPO, para tratar la anemia causada por agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia.

Los polipéptidos de la trampa de GDF, opcionalmente combinados con un activador del receptor de la EPO, también serían adecuados para el tratamiento de las anemias de la maduración de los RBC desordenados, que se caracterizan en parte por RBC de tamaño insuficiente (microcíticos), de gran tamaño (macrocíticos), deformados o de color anormal 5 (hipocromáticos).

En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en combinación (por ejemplo, administrados al mismo tiempo o en diferentes momentos, pero generalmente de manera tal que se logren efectos farmacológicos superpuestos) con terapias de apoyo para la eritropoyesis inefectiva. Tales terapias incluyen la 10 transfusión con glóbulos rojos o sangre entera para tratar la anemia. En las anemias crónicas o hereditarias, los mecanismos normales para la homeostasis del hierro se ven superados por las transfusiones repetidas, lo que con el tiempo lleva a una acumulación tóxica y potencialmente mortal de hierro en tejidos vitales tales como el corazón, el hígado y las glándulas endocrinas. Por lo tanto, las terapias de apoyo para pacientes crónicos con eritropoyesis inefectiva también incluyen el tratamiento con una o más moléculas quelantes de hierro para promover la excreción 15 de hierro en la orina y/o las heces y, por lo tanto, impedir o revertir, la sobrecarga de hierro tisular (Hershko, 2006, Haematologica 91:1307-1312; Cao y col, 2011, Pediatr Rep 3 (2):e17). Los agentes quelantes de hierro efectivos deben poder unir y neutralizar selectivamente el hierro férrico, la forma oxidada del hierro unido a no transferrina que probablemente representa la mayor toxicidad del hierro a través de la producción catalítica de radicales hidroxilo y 20 productos de oxidación (Esposito y col, 2003, Blood 102:2670-2677). Estos agentes son estructuralmente diversos, pero todos poseen átomos donadores de oxígeno o nitrógeno capaces de formar complejos de coordinación octaédricos neutralizantes con átomos de hierro individuales en estequiométrias de 1:1 (agentes hexadentados), 2:1 25 (tridentados) o 3:1 (bidentados) (Kalinowski y col, 2005, Pharmacol Rev 57:547-583). Los agentes quelantes de hierro eficaces también tienen un peso molecular relativamente bajo (menos de 700 daltons), con solubilidad tanto en agua como en lípidos para permitir el acceso a los tejidos afectados. Los ejemplos específicos de moléculas quelantes de 30 hierro son la deferoxamina, un agente hexadentado de origen bacteriano que requiere administración parenteral diaria, y los agentes sintéticos oralmente activos deferiprona (bidentada) y deferasirox (tridenteado). La terapia combinada que consiste en la administración en el mismo día de dos agentes quelantes de hierro se muestra prometedora en pacientes que no responden a la monoterapia con quelación y también en la solución de problemas de cumplimiento deficiente de los pacientes con deferoxamina sola (Cao y col, 2011, Pediatr Rep 3 (2):e17; Galanello y col, 2010, Ann NY Acad Sci 1202:79-86).

En determinados casos, los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en combinación con agonistas de hepcidina para la eritropoyesis inefectiva. Como un polipéptido circulante producido principalmente en el hígado, la hepcidina se considera un regulador maestro del metabolismo del hierro debido a su capacidad para inducir la 35 degradación de la ferroportina, una proteína de exportación de hierro localizada en enterocitos absorbentes, hepatocitos y macrófagos. En términos generales, la hepcidina reduce la disponibilidad de hierro extracelular, por lo que los agonistas de la hepcidina pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la eritropoyesis inefectiva (Nemeth, 2010, Adv Hematol 2010:750643). Esta visión está respaldada por los efectos beneficiosos del aumento de la expresión de hepcidina en un modelo de ratón de la β-talasemia (Gardenghi y col, 2010, J Clin Invest 120:4466-4477).

Además, como se muestra en este documento, los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en combinación 40 con los activadores del receptor de EPO para lograr un aumento en los glóbulos rojos en intervalos de dosis más bajos. Esto puede ser beneficioso para reducir los efectos conocidos colaterales y los riesgos asociados con altas dosis de activadores del receptor de EPO. En determinados casos, la presente descripción proporciona procedimientos 45 para tratar o impedir la anemia en un individuo que lo necesita administrando al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la trampa de GDF o una combinación (o terapia conjunta) de un polipéptido de la trampa de GDF y un activador del receptor de EPO. Estos procedimientos pueden usarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos, y en particular de seres humanos.

50 Los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en combinación con los activadores del receptor de EPO para reducir la dosis requerida de estos activadores en pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de la EPO. Los efectos adversos principales de la EPO son un aumento excesivo en los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles elevados de hematocrito pueden provocar hipertensión (más particularmente agravamiento de la hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos adversos de la EPO que se han reportado, algunos de los cuales 55 se relacionan con la hipertensión, son dolores de cabeza, síndrome similar a la gripe, obstrucción de derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debidas a trombosis, encefalopatía hipertensiva y enfermedad de glóbulos rojos (Singibarti, (1994) J. Clin Investig 72 (supl. 6), S36-S43; Horler y col. (2000) Nephrol Dial Transplant 15 (suppl 4), 51-56; Delanty y col. (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346 (7), 522-523).

60 El efecto rápido sobre los niveles de glóbulos rojos de los polipéptidos de la trampa de GDF descritos en este documento indica que estos agentes actúan por un mecanismo diferente al de la EPO. En consecuencia, estos

- antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos en pacientes que no responden bien a la EPO. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis de EPO normal a mayor ($> 300 \text{ UI/kg/semana}$) no produce un aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel objetivo. Se encuentran pacientes con una respuesta EPO inadecuada para todos los tipos de anemia, pero se ha observado un mayor número de pacientes que no responden con especial frecuencia en pacientes con cáncer y pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. Una respuesta inadecuada a la EPO puede ser constitutiva (es decir, observada con el primer tratamiento con EPO) o adquirida (por ejemplo, observada con el tratamiento repetido con EPO).
- 10 Los pacientes pueden ser tratados con un régimen de dosificación destinado a restaurar al paciente a un nivel de hemoglobina objetivo, generalmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl, y típicamente aproximadamente de 11,0 g/dl (véase también Jacobs y col. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), aunque los niveles objetivos más bajos pueden causar menos efectos secundarios cardiovasculares. Como alternativa, los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupada por las células) se pueden usar como una medida para el estado de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos varían de 41 a 51 % para hombres adultos y de 35 a 45 % para mujeres adultas. Los niveles de hematocrito objetivo suelen ser de alrededor del 30-33 %. Además, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por lo tanto, de manera óptima, el nivel de hemoglobina/hematocrito objetivo se puede individualizar para cada paciente.
- 15 20 En determinados casos, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar a un paciente que ha sido tratado con, o es un candidato para ser tratado con, un polipéptido de la trampa de GDF mediante la medición de uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos se pueden usar para evaluar la dosificación adecuada para un paciente que es candidato a ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF, para monitorizar los parámetros hematológicos durante el tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF, para evaluar 25 si ajustar la dosis durante el tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF, y/o para evaluar una dosis de mantenimiento adecuada de un polipéptido de la trampa de GDF. Si uno o más de los parámetros hematológicos están fuera del nivel normal, la dosificación con un polipéptido de la trampa de GDF puede reducirse, retrasarse o terminarse.
- 30 Los parámetros hematológicos que pueden medirse conforme a los procedimientos proporcionados en este documento incluyen, por ejemplo, niveles de glóbulos rojos, presión arterial, reservas de hierro y otros agentes que se encuentran en los fluidos corporales que se correlacionan con niveles aumentados de glóbulos rojos, usando procedimientos reconocidos en la técnica. Dichos parámetros pueden determinarse utilizando una muestra de sangre de un paciente. Los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina y/o los niveles de hematocrito pueden causar aumentos en la presión arterial.
- 35 40 En un caso, si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es un candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF, entonces el inicio de la administración del polipéptido de la trampa de GDF puede retrasarse hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable, ya sea de forma natural o mediante intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, entonces el paciente puede ser tratado con un agente reductor de la presión arterial para reducir la presión arterial del paciente. Se puede usar cualquier agente reductor de la presión arterial adecuado para la afección del paciente individual, incluidos, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (incluidos los bloqueadores alfa y bloqueadores beta), vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o bloqueadores de los receptores de la angiotensina II.
- 45 50 La presión arterial puede tratarse como alternativa con una dieta y un régimen de ejercicio. De manera similar, si un paciente candidato tiene reservas de hierro que son más bajas de lo normal, o en el lado bajo de lo normal, entonces el paciente puede ser tratado con un régimen adecuado de dieta y/o suplementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a su normalidad. o nivel aceptable. Para los pacientes que tienen niveles de glóbulos rojos y/o niveles de hemoglobina más altos de lo normal, entonces la administración del polipéptido de la trampa de GDF puede retrasarse hasta que los niveles hayan regresado a un nivel normal o aceptable.
- 55 En determinados casos, si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es un candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF, entonces el inicio de la administración puede no retrasarse. Sin embargo, la cantidad de dosis o la frecuencia de dosificación del polipéptido de la trampa de GDF se puede establecer en una cantidad que reduzca el riesgo de un aumento inaceptable en los parámetros hematológicos que surgen tras la administración del polipéptido de la trampa de GDF. Como alternativa, se puede desarrollar un régimen terapéutico para el paciente que combine un polipéptido de la trampa de GDF con un agente terapéutico que aborde el nivel no deseado del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente tiene presión arterial elevada, luego se puede diseñar un régimen terapéutico que implique la administración de un polipéptido de la trampa de GDF y un agente reductor de la presión arterial. Para un paciente que tiene reservas de hierro inferiores a las deseadas, se puede desarrollar un régimen terapéutico de un polipéptido

de la trampa de GDF y una suplementación de hierro.

- En un caso, los parámetros iniciales para uno o más parámetros hematológicos pueden establecerse para un paciente que es candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF y establecer un régimen de dosificación adecuado para ese paciente en función del (de los) valor(es) inicial(es). Como alternativa, los parámetros iniciales establecidos basados en el historial médico de un paciente podrían usarse para informar un régimen de dosificación adecuado del polipéptido de la trampa de GDF para un paciente. Por ejemplo, si un paciente sano tiene una lectura de presión arterial inicial establecida que está por encima del intervalo normal definido, puede que no sea necesario llevar la presión arterial del paciente al intervalo que se considera normal para la población general antes del tratamiento con el polipéptido de la trampa de GDF. Los valores iniciales de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF también pueden usarse como los valores comparativos relevantes para monitorizar cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el polipéptido de la trampa de GDF.
- En determinados casos, uno o más parámetros hematológicos se miden en pacientes que están siendo tratados con un polipéptido de la trampa de GDF. Los parámetros hematológicos se pueden usar para monitorizar al paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o la terminación de la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF o la dosificación adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de un polipéptido de la trampa de GDF da como resultado un aumento en la presión arterial, el nivel de glóbulos rojos o el nivel de hemoglobina, o una reducción en las reservas de hierro, entonces la dosis del polipéptido de la trampa de GDF puede reducirse en cantidad o frecuencia, para disminuir los efectos del polipéptido de la trampa de GDF en uno o más parámetros hematológicos. Si la administración o un polipéptido de la trampa de GDF produce un cambio en uno o más parámetros hematológicos que son adversos para el paciente, luego, la dosificación del polipéptido de la trampa de GDF puede terminarse temporalmente, hasta que (el)los parámetro(s) hematológico(s) vuelvan a un nivel aceptable, o permanentemente. De manera similar, si uno o más parámetros hematológicos no se encuentran dentro de un intervalo aceptable después de reducir la dosis o la frecuencia de administración del polipéptido de la trampa de GDF, la dosis puede terminarse. Como una alternativa, o además de reducir o terminar la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF, el paciente puede recibir una dosis de un agente terapéutico adicional que aborde el nivel indeseable en el(los) parámetro(s) hematológico(s), tal como, por ejemplo, un agente reductor de la presión arterial o un suplemento de hierro. Por ejemplo, si un paciente que está siendo tratado con un polipéptido de la trampa de GDF tiene presión arterial elevada, entonces la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF puede continuar en el mismo nivel y se añade un agente reductor de la presión arterial al régimen de tratamiento, la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF puede reducirse (por ejemplo, en cantidad y/o frecuencia) y se añade un agente reductor de la presión arterial al régimen de tratamiento, o puede terminarse la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF y el paciente puede ser tratado con un agente reductor de la presión arterial.

6. Composiciones farmacéuticas

- En determinados casos, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF) de la presente descripción se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objetivo se pueden formular para la administración por cualquier vía conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.
- En determinados casos, el procedimiento terapéutico de la descripción incluye administrar la composición por vía sistémica, o local, como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos de la trampa de GDF que también pueden incluirse opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos objetivo (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF) en los procedimientos de la descripción.

Típicamente, los compuestos se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos de la trampa de GDF en combinación con uno o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, aceites (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos

inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

- 5 Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para suministrarla a un sitio de tejido objetivo (por ejemplo, la médula ósea). En determinados casos, las composiciones de la presente descripción pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF) a un sitio de tejido objetivo (por ejemplo, la médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y con capacidad óptima de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación
- 10 lenta de los polipéptidos de la trampa de GDF. Tales matrices se pueden formar con materiales que actualmente se usan para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de la interfaz. La aplicación concreta de las composiciones objetivo definirá la formulación adecuada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Las matrices adicionales comprenden proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como la hidroxiapatita, el biovidrio, los aluminatos u otros materiales cerámicos sinterizados. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos de material anteriormente mencionados, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Los biocerámicos pueden modificarse en su composición, tal como en el fosfato de aluminato de calcio y el procesamiento para alterar el tamaño de los poros, el tamaño de las partículas, la forma de las partículas y la biodegradabilidad.

- 25 En determinados casos, los procedimientos de la descripción se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas (utilizando una base con sabor, generalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares,
- 30 cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, un electuario o una pasta.

En las formas de dosificación sólidas para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente descripción se pueden mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes dispersantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y pastillas, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina llenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol benzílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes de suspensión y emulsionantes, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

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

Las composiciones de la descripción también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, 5 clorobutanol, ácido fenólico sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

- 10 Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico tratante considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objetivo de la descripción (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF). Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones diagnósticas, el recuento deseado de glóbulos rojos, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a un nivel deprimido de glóbulos rojos, el tiempo 15 de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosificación. El progreso se puede monitorizar mediante la evaluación periódica de los glóbulos rojos y los niveles de hemoglobina, así como las evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del procedimiento hematopoyético.
- 20 En determinados casos, la presente descripción también proporciona terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos de la trampa de GDF. Tal terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. El suministro de secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF se puede lograr utilizando un vector de expresión recombinante, tal como un virus químérico o un sistema de dispersión coloidal. Para el suministro terapéutico de 25 secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

Los diversos vectores virales que se pueden utilizar para la terapia génica como se enseña en este documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vacuna o un virus de ARN tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único 30 gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de forma que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de un objetivo mediante la unión de, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o 35 una proteína. El direccionamiento preferido se puede conseguir usando un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que pueden insertarse secuencias polinucleotídicas específicas en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir el suministro específico del objetivo del vector retroviral que contiene el polinucleótido de la trampa de GDF.

- 40 Como alternativa, las células de cultivo de tejido pueden transfectarse directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectan luego con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.
- 45 Otro sistema de suministro dirigido para los polinucleótidos de la trampa de GDF es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta descripción es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse 50 dentro del interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, y col., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los procedimientos para la transferencia de genes eficiente usando un vehículo de liposoma, son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, Mannino, y col., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es generalmente una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros lípidos u otros fosfolípidos. Las características 55 físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilsérina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El 60 direccionamiento de los liposomas también es posible basándose, por ejemplo, en la especificidad de los órganos, la especificidad de las células y la especificidad de los orgánulos, y se conoce en la técnica.

EJEMPLIFICACIÓN

La invención que se describe ahora en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos 5 que se incluyen simplemente con fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no están destinados a limitar la invención.

Ejemplo 1. Generación de una trampa de GDF.

- 10 Los solicitantes construyeron una trampa de GDF de la siguiente manera. Un polipéptido que tiene un dominio extracelular modificado de ActRIIB con una unión de activina A muy reducida en relación con GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución de leucina a aspartato en la posición 79 en la SEQ ID NO: 1) se fusionó a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo (tres aminoácidos de glicina) en medio. Las construcciones se denominan ActRIIB (L79D 20-134)-hFc y ActRIIB (L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Las formas alternativas 15 con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 se realizaron de manera similar (L79E). Las formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a la SEQ ID NO: 7, también se generaron a continuación y se realizaron de manera equivalente en todos los aspectos probados. El aspartato en la posición 79 (en relación con la SEQ ID NO: 1, o la posición 60 en relación con la SEQ ID NO: 7) se resalta en gris a continuación. La valina en la posición 226 en relación con la SEQ ID NO: 7 también se resalta en gris a continuación.
- 20 La trampa de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc se muestra a continuación como purificada a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCW~~DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT~~
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

- 25 La porción derivada de ActRIIB de la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos que se establece a continuación (SEQ ID NO: 32), y esa porción podría usarse como un monómero o como una proteína de fusión no Fc como un monómero, dímero o complejo de orden mayor.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
 LVKKGCW~~DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE~~
 PPPTAPT

30 (SEQ ID NO: 32)

- La proteína de la trampa de GDF se expresó en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:
- 35 (i) Melitina de abeja melífera (HBML):

MKFLVNVALVFMVVYISYIYA

40 (SEQ ID NO: 8)

(ii) Activador del plasminógeno tisular (TPA):

MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP

(SEQ ID NO: 9)

5

(iii) Nativa:

MTAPWVALALLWGSLCAGS

10 (SEQ ID NO: 10).

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

MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWCDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ

15

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 11)

20 Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 12):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
 CGCCCGGCAC CTCTGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
 ACTGGGAGCT GGAGCGCAC ACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
 AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAAGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTGCCCAGA GGCTGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCCACCG
 GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
 TCTCCTCTT CCCCCAAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGG A GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
 ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAGGCT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCTC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
 AGAACCGAGT CAGCCTGACC TGCCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGCAG CCGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

La purificación se podría lograr mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo,

tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q-sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón. En un ejemplo de un esquema de purificación, el medio de cultivo celular se pasa sobre una columna de proteína A, se lava en Tris/NaCl 150 mM (pH 5 8,0), luego se lava en Tris/NaCl 50 mM (pH 8,0) y se eluye con glicina 0,1 M, pH 3,0. El eluato de pH bajo se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos como una etapa de eliminación viral. El eluato se neutraliza luego y se pasa a través de una columna de intercambio de iones Q sefarosa y se lava en Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, y se eluye en Tris 50 mM, pH 8,0 con una concentración de NaCl entre 150 mM y 300 mM. El eluato se cambia luego a Tris 50 mM, pH 8,0, sulfato de amonio 1,1 M, se pasa sobre una columna de fenil sefarosa, se lava y se eluye en Tris 10 50 mM a pH 8,0 con sulfato de amonio entre 150 y 300 mM. El eluato se dializa y se filtra para su uso.

Las trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la relación de unión de activina A en relación con la miostatina o GDF11) se describen en los documentos PCT/US2008/001506 y WO 2006/012627.

15

Ejemplo 2. Bioensayo para la señalización mediada por GDF-11 y activina.

Se utilizó un ensayo de gen reportero A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF en la señalización de GDF-11 y activina A. Línea celular: rabdomiosarcoma humano (derivado del músculo).

20 Vector reportero: pGL3 (CAGA) 12 (descrito en Dennler y col, 1998, EMBO 17: 3091-3100). 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente en los genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores de señalización a través de Smad2 y 3.

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

25

Día 2: Se transfecan células A-204 con 10 ug pGL3(CAGA) 12 o pGL3(CAGA) 12(10 ug) + pRLCMV (1 ug) y Fugene.

Día 3: Añadir factores (diluidos en medio + BSA al 0,1 %). Los inhibidores deben estar preincubados con factores durante 1 hora antes de añadirlos a las células. 6 horas más tarde, las células se enjuagaron con PBS y se lisaron las 30 células.

Esto es seguido por un ensayo de luciferasa. En ausencia de inhibidores, la activina A mostró una estimulación de 10 veces la expresión del gen reportero y un DE50 ~ 2 ng/ml. GDF-11:16 veces la estimulación, DE50: ~ 1,5 ng/ml.

35 ActRIIB (20-134) es un potente inhibidor de la actividad de activina, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. También se probaron variantes en este ensayo.

Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 por truncamientos N-terminal y C-terminal

40 Se generaron y probaron variantes de ActRIIB (20-134)-hFc con truncamientos en el extremo N y/o el extremo C para probar su actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. Las actividades se muestran a continuación (según lo medido en medios condicionados):

Truncamientos ActRIIB-hFc C-terminal:

| | CI50 (ng/ml) | |
|-----------------------|--------------|----------|
| | GDF-11 | Activina |
| ActR 11 B(20-134)-hFc | 45 | 22 |
| ActRIIB(20-132)-hFc | 87 | 32 |
| ActRIIB(20-131)-hFc | 120 | 44 |
| ActRIIB(20-128)-hFc | 130 | 158 |

Como puede verse, los truncamientos de tres (que terminan con ... PPT), seis (que terminan con ... YEP) o más aminoácidos en el extremo C causan una disminución de la actividad de la molécula de tres veces o más. El 5 truncamiento de los 15 aminoácidos finales de la porción ActRIIB causa una mayor pérdida de actividad (véase el documento W02006012627).

Los truncamientos amino terminales se realizaron en el original de una proteína ActRIIB (20-131)-hFc. Las actividades se muestran a continuación (según lo medido en medios condicionados):

10

Truncamientos ActRIIB-hFc N-terminal:

| | CI50 (ng/ml) | |
|------------------------------|--------------|----------|
| | GDF-11 | Activina |
| ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...) | 183 | 201 |
| ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...) | 121 | 325 |
| ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...) | 71 | 100 |
| ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...) | 60 | 43 |
| ActRIIB(24-131)-hFc AET...) | 69 | 105 |

En consecuencia, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N conducen a la producción de 15 una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud completa. Los experimentos adicionales muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIB (25-131)-hFc tiene una actividad equivalente a la forma no truncada, y las delecciones adicionales en el extremo N continúan degradando la actividad de la proteína. Por lo tanto, las construcciones óptimas tendrán un extremo C que termina entre el aminoácido 133-134 de la SEQ ID NO: 1 y un extremo N que comienza en los aminoácidos 22-24 de la SEQ ID NO: 1. Un extremo N que corresponde a 20 los aminoácidos 21 o 25 darán una actividad que es similar a la construcción ActRIIB (20-134)-hFc. Estos truncamientos también se pueden usar en el contexto de las trampas de GDF, tal como una variante L79D o L79E.

Ejemplo 4. Variantes de ActRIIB-Fc, actividad basada en células.

25 La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF se probó en un ensayo basado en células, como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Algunas variantes se probaron en diferentes construcciones de truncamiento C-terminal. Como se explicó anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos causaron una reducción en la actividad. Las trampas de GDF (variantes de L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de la unión a activina al tiempo que conservaban una inhibición casi natural de GDF- 30 11.

Unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF-11 y activina A:

| Variaciones de ActRIIB-Fc | Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1) | Actividad de inhibición de GDF11 | Actividad de inhibición de activina |
|---------------------------|--|---|---|
| R64 | 20-134 | +++ (aprox. 10 ⁻⁸ M K _i) | +++ (aprox. 10 ⁻⁸ M K _i) |

(continuación)

| | | | |
|-----------------|--------|--|--|
| A64 | 20-134 | + (aprox. 10^{-6} M K _i) | + (aprox. 10^{-6} M K _i) |
| R64 | 20-129 | +++ | +++ |
| R64 K74A | 20-134 | ++++ | ++++ |
| R64 A24N | 20-134 | +++ | +++ |
| R64 A24N | 20-119 | ++ | ++ |
| R64 A24N K74A | 20-119 | + | + |
| R64 L79P | 20-134 | + | + |
| R64 L79P K74A | 20-134 | + | + |
| R64 L79D | 20-134 | +++ | + |
| R64 L79E | 20-134 | +++ | + |
| R64K | 20-134 | +++ | +++ |
| R64K | 20-129 | +++ | +++ |
| R64 P129S P130A | 20-134 | +++ | +++ |
| R64N | 20-134 | + | + |

+ Actividad deficiente (aproximadamente 1×10^{-6} K_i)
 ++ Actividad moderada (aproximadamente, 1×10^{-7} K_i)
 +++ Buena actividad (tipo natural) (aproximadamente 1×10^{-8} K_i)
 +++++ Mayor que la actividad de tipo natural

Se han evaluado varias variantes para determinar la semivida sérica en ratas. ActRIIB (20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB (A24N 20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividad en el ensayo basado en células (arriba) y en ensayos *in vivo* (abajo) que son equivalentes a la molécula de tipo natural. Junto con la semivida más larga, esto significa que con el tiempo una variante A24N proporcionará mayor efecto por unidad de proteína que la molécula de tipo natural. La variante A24N, y cualquiera de las otras variantes analizadas anteriormente, pueden combinarse con las moléculas de la trampa de GDF, tal como las variantes L79D o L79E.

10 Ejemplo 5. Unión a GDF-11 y activina A.

La unión de determinadas proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF a los ligandos se probó en un ensayo BiaCore™.

- Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína de tipo natural se capturaron en el sistema utilizando un anticuerpo anti-hFc.
 15 Los ligandos se inyectaron y fluyeron sobre las proteínas receptoras capturadas. Los resultados se resumen en las tablas a continuación.

Variantes IIB de especificidad de unión a ligando.

| Proteína | GDF11 | | |
|--------------------------|------------|------------|----------|
| | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M) |
| ActRIIB(20-134)-hFc | 1,34e-6 | 1,13e-4 | 8,42e |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc | 1,21e-6 | 6,35e-5 | 5,19e-11 |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc | 6,7e-5 | 4,39e-4 | 6,55e-10 |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc | 3,8e-5 | 2,74e-4 | 7,16e-10 |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc | 6,77e-5 | 2,41e-5 | 3,56e |
| GDF8 | | | |
| Proteína | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M) |
| ActRIIB(20-134)-hFc | 3,69e-5 | 3,45e-5 | 9,35e-11 |

(continuación)

| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc | | | |
|----------------------------------|------------|------------|-------------------|
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc | 3,85e-5 | 8,3e-4 | 2,15e-9 |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc | 3,74e-5 | 9e-4 | 2,41e-9 |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc | 2,25e-5 | 4,71e-5 | 2,1e-10 |
| ActRIIB(R64K 20-129)-hFc | 9,74e-4 | 2,09e-4 | 2,15e-9 |
| ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc | 1,08e-5 | 1,8e-4 | 1,67e-9 |
| ActRIIB(K74A 20-134)-hFc | 2,8e-5 | 2,03e-5 | 7,18e-11 |
| | | | |
| | | | Activina A |
| Proteína | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M) |
| ActRIIB(20-134)-hFc | 5,94e6 | 1,59e-4 | 2,68e-11 |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc | 3,34e6 | 3,46e-4 | 1,04e-10 |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc | | | Baja unión |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc | | | Baja unión |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc | 6,82e6 | 3,25e-4 | 4,76e-11 |
| ActRIIB(R64K 20-129)-hFc | 7,46e6 | 6,28e-4 | 8,41e-11 |
| ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc | 5,02e6 | 4,17e-4 | 8,31e-11 |

Estos datos confirman los datos del ensayo basado en células, lo que demuestra que la variante A24N conserva la actividad de unión al ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB (20-134)-hFc, y que la molécula L79D o L79E conserva la unión de miostatina y GDF11, pero muestra unión marcadamente disminuida (no cuantificable) a activina A.

Otras variantes se han generado y probado, como se informa en el documento W02006012627, véase, por ejemplo, las páginas 59-60, que utilizan ligandos acoplados

10

al dispositivo y un receptor que fluye sobre los ligandos acoplados. En particular, K74Y, K74F, K74I (y presumiblemente otras sustituciones hidrófobas en K74, tal como K74L), y D80I, causan una disminución en la relación de unión de activina A a GDF11, en relación con la molécula K74 de tipo natural. A continuación se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes:

15

Variantes de ActRIIB-Fc solubles que se unen a GDF-11 y activina A (ensayo BiaCore)

| ActRIIB | ActA | GDF11 |
|--------------|--------------------|--------------------|
| WT (64A) | KD=1,8e-7M (+) | KD= 2,6e-7M (+) |
| WT (64R) | na | KD= 8,6e-8M (+++) |
| + 15 de cola | KD ~2,6 e-8M (+++) | KD= 1,9e-8M (++++) |
| E37A | * | * |
| R40A | - | - |
| D54A | - | * |
| K55A | ++ | * |
| R56A | * | * |
| K74A | KD=4,35e-9 M +++++ | KD=5,3e-9M +++++ |

(continuación)

| | | |
|------|----|-----|
| K74Y | * | --- |
| K74F | * | --- |
| K74I | * | --- |
| W78A | * | * |
| F79A | + | * |
| D80K | * | * |
| D80R | * | * |
| D80A | * | * |
| D80F | * | * |
| D80G | * | * |
| D80M | * | * |
| D80N | * | * |
| D80I | * | --- |
| F82A | ++ | - |

* No se observó unión
-- <1/5 de unión a WT
- <1/2 de unión a WT
+ WT
++ < 2 de aumento de unión
+++ ~5 de aumento de unión
++++ ~10 de aumento de unión
+++++ ~ 40 de aumento de unión

Ejemplo 6. ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis en primates no humanos

ActRIIB (20-134)-hFc (IgG1) se administró una vez a la semana durante 1 mes a monos cynomolgus machos y 5 hembras mediante inyección subcutánea. Cuarenta y ocho monos cynomolgus (24/sexo) se asignaron a uno de cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se administraron inyecciones subcutáneas de vehículo o ActRIIB-hFc a 3, 10 o 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron patología clínica general (hematología, química clínica, coagulación y análisis de orina). ActRIIB-hFc causó valores de reticulocitos absolutos medios elevados estadísticamente significativos el día 15 en animales tratados. En el día 36, 10 ActRIIB-hFc causó varios cambios hematológicos, incluidos los valores de reticulocitos absolutos medios elevados y valores de ancho de distribución de glóbulos rojos y menor concentración media de hemoglobina corpuscular. Todos los grupos tratados y ambos sexos fueron afectados. Estos efectos son consistentes con un efecto positivo de ActRIIB-hFc en la liberación de reticulocitos inmaduros de la médula ósea. Este efecto se revirtió después de que el fármaco se lavara de los animales tratados (hasta el día 56 del estudio). En consecuencia, se concluye que ActRIIB-hFc 15 estimula la eritropoyesis.

Ejemplo 7. ActRIIB-mFc promueve aspectos de la eritropoyesis en ratones mediante la estimulación de actividades eritropoyéticas esplénicas

20 En este estudio, se analizaron los efectos de la administración *in vivo* de ActRIIB (20-134)-mFc en la frecuencia de los progenitores hematopoyéticos en la médula ósea y el bazo. Un grupo de ratones C57BL/6 fue inyectado con PBS como control y un segundo grupo de ratones fue administrado dos dosis de ActRIIB-mFc a 10 mg/kg y ambos grupos fueron sacrificados después de 8 días. Se utilizó sangre periférica para realizar recuentos sanguíneos completos y se utilizaron fémures y bazos para realizar ensayos clonogénicos *in vitro* para evaluar el contenido de células progenitoras 25 linfoides, eritroides y mieloides en cada órgano. En el breve período de tiempo de este estudio, no se observaron cambios significativos en los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o glóbulos blancos en los ratones tratados. En los fémures no hubo diferencia en el número de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre el control y los grupos tratados. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo en el número de colonias de progenitores eritroides (UFC-E) maduros por placa, la frecuencia y el número de 30 progenitores totales por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (UFB-E) y el número total de progenitores por bazo.

Animales:

Se usaron dieciséis ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad en el estudio. Ocho ratones fueron inyectados por vía subcutánea con el compuesto de ensayo ActRIIB-mFc en los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y ocho ratones fueron inyectados por vía subcutánea con control vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), a un volumen 5 de 100 µl por ratón. Todos los ratones se sacrificaron 8 días después de la primera inyección conforme a las pautas de cuidado de animales relevantes. Las muestras de sangre periférica (SP) de animales individuales se recogieron mediante punción cardíaca y se utilizaron para recuentos sanguíneos completos y diferenciales (RSC/Dif). Se recogieron fémures y bazos de cada ratón.

10 Pruebas realizadas:

Recuentos RSC/Dif

Se recogió SP de cada ratón mediante punción cardíaca y se colocó en los tubos de microtainer adecuados. Las 15 muestras se enviaron a CLV para su análisis en un contador CellDyn 3500.

Ensayos clonogénicos

Los progenitores clonogénicos de los linajes mieloide, eritroide y linfoide se evaluaron utilizando los sistemas de 20 medios basados en metilcelulosa *in vitro* que se describen a continuación.

Progenitores eritroides maduros:

Los progenitores clonogénicos de los linajes eritroides maduros (UFC-E) se cultivaron en MethoCult™ 3334, un medio 25 basado en metilcelulosa que contiene eritropoyetina humana (rh) recombinante (3 U/ml).

Progenitores linfoideos:

Los progenitores clonogénicos del linaje linfoide (UFC-pre-B) se cultivaron en MethoCult® 3630, un medio basado en 30 metilcelulosa que contiene rh interleucina 7 (10 ng/ml).

Progenitores mieloides y eritroides inmaduros:

Los progenitores clonogénicos de los linajes de monocitos de granulocitos (UFC-GM), eritroides (UFB-E) y 35 multipotenciales (UFC-GEMM) se cultivaron en MethoCult™ 3434, un medio basado en metilcelulosa que contiene factor recombinante de células madre murinas (rm) (50 ng/ml), rh interleucina 6 (10 ng/mF), rm interleucina 3 (10 ng/mF) y rh eritropoyetina (3 U/mF).

Procedimientos:

40 Los fémures y bazos de ratón se procesaron mediante protocolos estándar. En resumen, la médula ósea se obtuvo lavando la cavidad femoral con medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero bovino fetal al 2 % (IMDM al 2 % de FBS) utilizando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cc. Las células del bazo se obtuvieron triturando los bazos a través de un filtro de 70 µM y enjuagando el filtro con IMDM al 2 % de FBS. Los recuentos de células 45 nucleadas en ácido acético glacial al 3 % se realizaron luego en las suspensiones de células individuales utilizando una cámara de recuento Neubauer para poder calcular el total de células por órgano. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes, las células de bazo totales se diluyeron luego con 3 veces el volumen de tampón de lisis de cloruro de amonio y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las células se lavaron luego y se volvieron a suspender en IMDM al 2 % de FBS y se realizó un segundo recuento de células para determinar la concentración de células de las células 50 50 después de la lisis.

Se hicieron reservas de células y se añadieron a cada formulación de medio basada en metilcelulosa para obtener las concentraciones de recubrimiento óptimas para cada tejido en cada formulación de medio. Las células de la médula ósea se colocaron en placas con 1×10^5 células por placa en MethoCult™ 3334 para evaluar los progenitores eritroides 55 maduros, 2×10^5 células por placa en MethoCult™ 3630 para evaluar los progenitores linfoideos y 3×10^4 células por placa en MethoCult™ 3434 para evaluar los progenitores inmaduros eritroides y mieloides. Las células del bazo se colocaron en placas con 4×10^5 células por placa en MethoCult™ 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, 4×10^5 células por placa en MethoCult™ 3630 para evaluar los progenitores linfoideos y 2×10^5 células por placa en MethoCult™ 3434 para evaluar los progenitores inmaduros eritroides y mieloides. Los cultivos en placas 60 triplicadas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, hasta que la enumeración y evaluación de la colonia fue realizada por personal capacitado.

Los progenitores eritroides maduros se cultivaron durante 2 días, los progenitores linfoides se cultivaron durante 7 días y los progenitores eritroides y mieloides maduros se cultivaron durante 12 días.

5 Análisis:

La media +/- 1 desviación estándar se calculó para los cultivos por triplicado de los ensayos clonogénicos y para los grupos de control y tratamiento para todos los conjuntos de datos.

10 La frecuencia de las células formadoras de colonias (CFC) en cada tejido se calculó de la siguiente manera:

Células en placa por placa

CFC media anotada por placa

15

Las CFC totales por fémur o bazo se calcularon de la siguiente manera:

CFC total anotada x recuento de células nucleadas por fémur o bazo (después de la lisis de RBC)

20 Número de células nucleadas cultivadas

Se realizaron pruebas t estándar para evaluar si había diferencias en el número medio de células o progenitores hematopoyéticos entre los ratones de control con PBS y los ratones tratados con el compuesto. Debido a la subjetividad potencial de la enumeración de colonias, un valor de p inferior a 0,01 se considera significativo. Los valores medios (+/- DE) para cada grupo se muestran en las tablas a continuación.

Tabla: Parámetros hematológicos

| Grupo de tratamiento | Glóbulos blancos (x10 ⁹ /L) | Glóbulos rojos (x10 ⁹ /L) | Hemoglobina (g/l) | Hematocrito (l/l) |
|----------------------|---|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| PBS (n = 8) | 9,53 +/- 1,44 | 10,5 +/- 1,1 | 160,9 +/- 13,3 | 0,552 +/- 0,057 |
| ActRIIB-mFc (n=8) | 9,77 +/- 1,19 | 10,8 +/- 0,3 | 162,1 +/- 4,1 | 0,567 +/- 0,019 |

30

Tabla: CFC de fémur y bazo

| Grupo de tratamiento | CFC total por fémur | CFC total por bazo | CFC-E total por fémur | CFC-E total por bazo |
|----------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| PBS (n = 8) | 88 +/- 10 | 54 +/- 14 | 156 +/- 27 | 131 +/- 71 |
| ActRIIB-mFc (Δ =8) | 85 +/- 9 | 79 +/- 6 | 164 +/- 23 | 436 +/- 86 |

* el análisis preliminar indica p <0,05

El tratamiento de ratones con ActRIIB (20-134)-mFc, en el breve período de tiempo de este estudio, no produjo aumentos significativos en el contenido de hemoglobina o glóbulos rojos. Sin embargo, el efecto en el contenido de células progenitoras fue notable. En los fémures no hubo diferencia en el número de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre el control y los grupos tratados. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo en el número de células nucleadas antes de la lisis de glóbulos rojos y en el número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, la frecuencia y el número de progenitores totales por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (UFB-E) y el número total de progenitores por bazo. En consecuencia, se espera que a lo largo de un curso de tiempo más largo, el tratamiento con ActRIIB(20-134)-mFc pueda producir contenidos elevados hemoglobina y glóbulos rojos.

Ejemplo 8: Una trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

Se asignaron ratones C57BL/6NTac macho de doce semanas de edad a uno de dos grupos de tratamiento (N = 10).
 5 A los ratones se les administró un vehículo o una variante del polipéptido ActRIIB ("trampa de GDF") [ActRIIB (L79D 20-134)-hFc] mediante inyección subcutánea (SC) a 10 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. Al finalizar el estudio, se recogió sangre entera mediante punción cardíaca en tubos que contenían EDTA y se analizó la distribución celular mediante un analizador de hematología HM2 (Abaxis, Inc).

Designación de grupos

| Grupo | N | Ratones | Inyección | Dosis (mg/kg) | Ruta | Frecuencia |
|--------------|----------|----------------|--|----------------------|-------------|-------------------|
| 1 | 10 | C57BL/6 | PBS | 0 | SC | 2 veces/semana |
| 2 | 10 | C57BL/6 | polipéptido de la trampa de GDF [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc] | 10 | SC | 2 veces/semana |

10

El tratamiento con la trampa de GDF no tuvo un efecto estadísticamente significativo en el número de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles del vehículo. Los números de glóbulos rojos (RBC) aumentaron en el grupo tratado en relación con los controles (véase la tabla a continuación). Tanto el contenido de hemoglobina (HGB) como el hematocrito (HCT) también aumentaron debido a los glóbulos rojos adicionales. El ancho promedio de los glóbulos rojos (RDWc) fue mayor en los animales tratados, lo que indica un aumento en el grupo de glóbulos rojos inmaduros. Por lo tanto,

el tratamiento con la trampa de GDF conduce a aumentos en los glóbulos rojos, sin efectos distinguibles en las poblaciones de glóbulos blancos.

20

Resultados hematológicos

| | RBC 10¹²/l | HGB (g/dl) | HCT (%) | RDWc (%) |
|----------------------|------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| PBS | 10,7 ±0,1 | 14,8 ±0,6 | 44,8 ± 0,4 | 17,0 ±0,1 |
| Trampa de GDF | 12,4 ± 0,4** | 17,0 ± 0,7* | 48,8 ± 1,8* | 18,4 ± 0,2** |

*=p<0,05, **=p<0,01

Ejemplo 9: Una trampa de GDF es superior a ActRIIB-Fc para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*.

25 Se asignaron al azar ratones C57BL/6NTac macho de diecinueve semanas a uno de tres grupos. Los ratones recibieron dosis de vehículo (solución salina tamponada con Tris 10 mM, TBS), ActRIIB de tipo natural (20-134)-mFc o trampa de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc por inyección subcutánea dos veces por semana durante tres semanas. Se recogió sangre de la mejilla al inicio del estudio y después de tres semanas de dosificación y se analizó la distribución celular mediante un analizador de hematología (HM2, Abaxis, Inc.)

30

El tratamiento con ActRIIB-Fc o la trampa de GDF no tuvo un efecto significativo en los números de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles del vehículo. El recuento de glóbulos rojos (RBC), el hematocrito (HCT) y los niveles de hemoglobina se elevaron en los ratones tratados con la trampa de GDF en comparación con los controles o la construcción de tipo natural (véase la tabla a continuación). Por lo tanto, en una comparación directa, la trampa de GDF promueve aumentos en los glóbulos rojos en un grado significativamente mayor que una proteína ActRIIB-Fc de tipo natural. De hecho, en este experimento, la proteína ActRIIB-Fc de tipo natural no causó un aumento estadísticamente significativo en los glóbulos rojos, lo que sugiere que se necesitaría una dosis más prolongada o más alta para poner de manifiesto este efecto.

Resultados hematológicos después de tres semanas de dosificación

| | RBC ($10^{12}/\text{ml}$) | HCT % | HGB g/dl |
|----------------------|--------------------------------|-------------------|------------------|
| TBS | 11,06 \pm 0,46 | 46,78 \pm 1,9 | 15,7 \pm 0,7 |
| ActRHB-mFc | 11,64 \pm 0,09 | 49,03 \pm 0,3 | 16,5 \pm 1,5 |
| Trampa de GDF | 13,19 \pm 0,2** | 53,04 \pm 0,8** | 18,4 \pm 0,3** |

** = p<0,01

Ejemplo 10. Generación de una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado

5 Como se describe en el Ejemplo 1, se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB (L79D 20-134)-hFc por fusión N-terminal de TPA líder al dominio extracelular ActRIIB (restos 20-134 en la SEQ ID NO: 1) que contiene un sustitución de leucina a aspartato (en el resto 79 en la SEQ ID NO: 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con un enlazador mínimo (tres restos de glicina) (figura 3). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión se muestra en la figura 4.

10 Se generó una trampa de GDF con el dominio extracelular ActRIIB truncado, denominado ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, por fusión N-terminal de TPA líder al dominio extracelular truncado (restos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) que contiene un sustitución de leucina a aspartato (en el resto 79 en la SEQ ID NO: 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con un enlazador mínimo (tres restos de glicina) (figura 5). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta 15 proteína de fusión se muestra en la figura 6.

Ejemplo 11. Unión de ligando selectivo por trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado doble

La afinidad de las trampas de GDF y otras proteínas ActRIIB-hFc para varios ligandos se evaluó *in vitro* con un 20 instrumento Biacore™. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Los valores de Kd se obtuvieron por ajuste de afinidad en estado estable debido a la asociación y disociación muy rápidas del complejo, lo que impidió la determinación precisa de K_{on} y K_{off} .

Selectividad del ligando de las variantes de ActRIIB-hFc:

| Construcción de fusión | Activina A (Kd e-II) | Activina B (Kd e-II) | GDF11 (Kd e-II) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| ActRIIB(L79 20-134)-hFc | 1,6 | 1,2 | 3,6 |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc | 1350,0 | 78,8 | 12,3 |
| ActRIIB(L79 25-131)-hFc | 1,8 | 1,2 | 3,1 |
| ActRIIB(L79D 25-131)-hFc | 2290,0 | 62,1 | 7,4 |

25

La trampa de GDF con un dominio extracelular truncado, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, igualó o superó la selectividad del ligando mostrada por la variante más larga, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc, con una pronunciada pérdida de unión a activina A y activina B y retención casi completa de la unión a GDF11 en comparación con las contrapartes ActRIIB-hFc que carecen de la sustitución L79D. Tenga en cuenta que el truncamiento solo (sin sustitución L79D) no alteró la 30 selectividad entre los ligandos que se muestran en este caso [compare ActRIIB (L79 25-131)-hFc con ActRIIB (L79 20-134)-hFc].

Ejemplo 12. Generación de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc con secuencias de nucleótidos alternativas

35 Para generar ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, el dominio extracelular ActRIIB humano con una sustitución de aspartato en la posición nativa 79 (SEQ ID NO: 1) y con truncamientos N-terminales y C-terminales (restos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) se fusionó en el extremo N con una secuencia líder TPA en lugar del líder nativo ActRIIB y en el extremo C con un dominio Fc humano a través de un enlazador mínimo (tres restos de glicina) (figura 5). Una secuencia de nucleótidos 40 que codifica esta proteína de fusión se muestra en la figura 6 (SEQ ID NO: 27), y una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente la misma proteína de fusión se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 30). Esta proteína se expresó y se purificó utilizando la metodología descrita en el ejemplo 1.

Ejemplo 13. Una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado aumenta la proliferación de

progenitores eritroides en ratones

Se evaluó ActRIIB (L79D 25-131)-hFc para determinar su efecto en la proliferación de progenitores eritroides. Los ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) fueron tratados con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, sc; n = 6) o vehículo (TBS; n = 6) en los días 1 y 4, luego fueron sacrificados el día 8 para la recogida de bazo, tibias, fémures y sangre. Se aislaron células del bazo y la médula ósea, se diluyeron en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía un 5 % de suero bovino fetal, se suspendieron en medio basado en metilcelulosa especializado y se cultivaron durante 2 o 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en las etapas de unidades formadoras de colonias-eritroides (UFC-E) y de unidades formadoras de brotes-eritroides (UFB-E), respectivamente. El medio basado en metilcelulosa para la determinación de UFB-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluyó factor de células madre murinas recombinantes, la interleucina-3 y la interleucina-6, que no estaban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de UFC-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), mientras que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros constituyentes. Tanto para UFB-E como para UFC-E, el número de colonias se determinó en placas de cultivo duplicadas derivadas de cada muestra de tejido, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

Los cultivos derivados de bazo de ratones tratados con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc tuvieron el doble de colonias de UFC-E que los cultivos correspondientes de ratones de control ($P < 0,05$), mientras que el número de colonias de UFB-E no difirió significativamente con el tratamiento *in vivo*.

El número de colonias de UFC-E o UFB-E de los cultivos de médula ósea tampoco difirió significativamente con el tratamiento. Como se esperaba, el aumento en el número de colonias de UFC-E en cultivos derivados del bazo estuvo acompañado por cambios altamente significativos ($P < 0,001$) en el nivel de glóbulos rojos (aumento del 11,6 %), concentración de hemoglobina (aumento del 12 %) y nivel de hematocrito (aumento de 11,6 %) en la eutanasia en ratones tratados con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración *in vivo* de una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto global para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

Ejemplo 14. Una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado compensa la anemia inducida por quimioterapia en ratones

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los parámetros eritropoyéticos en un modelo de ratón de la anemia inducida por quimioterapia basada en paclitaxel, que inhibe la división celular al bloquear la polimerización de microtúbulos. Se asignaron ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) a uno de cuatro tratamientos:

- 1) paclitaxel (25 mg/kg, ip)
- 2) ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, ip)
- 3) paclitaxel + ActRIIB (L79D 25-131)-hFc
- 4) vehículo (TBS).

Paclitaxel se administró el día 0, mientras que ActRIIB (L79D 25-131)-hFc o vehículo se administró los días 0 y 3. Se recogieron muestras de sangre para el análisis de RSC de cohortes separadas los días 1, 3 y 5, y los resultados para los grupos de tratamiento 1-3 (arriba) se expresaron como diferencia porcentual del vehículo en un momento dado. El desgaste debido a la toxicidad de paclitaxel fue un problema en la cohorte de paclitaxel solo en el día 3 (en la que n = 1); de lo contrario, n = 3-5 por tratamiento por punto de tiempo. En comparación con el vehículo, el paclitaxel solo disminuyó la concentración de hemoglobina en casi un 13 % en el día 5, mientras que la adición de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc impidió esta disminución inducida por paclitaxel (**figura 11**). Se observaron efectos similares para los niveles de hematocrito y RBC. En ausencia de paclitaxel, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumentó la concentración de hemoglobina en un 10 % en comparación con el vehículo en los días 3 y 5 (**figura 11**). Por lo tanto, una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado puede aumentar los niveles de glóbulos rojos lo suficiente como para compensar la anemia inducida por la quimioterapia.

Ejemplo 15. Una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado revierte la anemia inducida por nefrectomía en ratones

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en la anemia en un modelo de ratón nefrectomizado de la enfermedad renal crónica. Los ratones C57BL/6 macho (11 semanas de edad) se sometieron a

una operación simulada o una nefrectomía unilateral para reducir la capacidad de producción de eritropoyetina. Los ratones recibieron una semana de recuperación posquirúrgica y luego fueron tratados dos veces a la semana con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, ip; n = 15 por condición) o vehículo (TBS; n = 15 por condición) durante un total de 4 semanas. Las muestras de sangre se recogieron antes del inicio de la dosificación y después de 4 semanas de tratamiento. Mientras que los ratones nefrectomizados tratados con vehículo mostraron una disminución significativa en el número de glóbulos rojos durante el período de tratamiento de 4 semanas, el tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc no solo evitó la disminución sino que también aumentó los niveles de glóbulos rojos 17 % ($P <0,001$) por encima del valor inicial (**figura 12**), a pesar de la reducción de la capacidad renal para la producción de eritropoyetina. En ratones nefrectomizados, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc también generó aumentos significativos desde el inicio en la concentración de hemoglobina y el nivel de hematocrito y, en particular, estimuló cada uno de estos parámetros eritropoyéticos en aproximadamente la misma medida en condiciones nefrectomizadas que en condiciones de operación simulada (**figura 13**). Por lo tanto, una trampa de GDF con el dominio extracelular ActRIIB truncado puede aumentar los niveles de glóbulos rojos lo suficiente como para revertir la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

15

Ejemplo 16. Una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado mejora la recuperación de la anemia inducida por pérdida de sangre en ratas

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los parámetros eritropoyéticos en un modelo de rata de la anemia inducida por pérdida de sangre aguda (anemia post-hemorrágica aguda). Las ratas Sprague-Dawley macho (aproximadamente 300 g) recibieron un catéter yugular crónico en el proveedor (Harlan). El día -1, se retiró el 20 % del volumen total de sangre de cada rata durante un período de 5 minutos a través del catéter bajo anestesia con isoflurano. El volumen de sangre extraída se basó en un valor para el volumen total de sangre calculado según la siguiente relación derivada de Lee y colaboradores (J Nucl Med 25:72-76, 1985) para ratas con un peso corporal superior a 120 g:

$$\text{Volumen total de sangre (ml)} = 0,062 \times \text{peso corporal (g)} + 0,0012$$

Se reemplazó un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato a través del catéter en el momento de la extracción de la sangre. Las ratas se trajeron con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, sc; n = 5) o vehículo (TBS; n = 5) en los días 0 y 3. Se trajeron muestras de sangre para el análisis de RSC mediante el catéter en los días -1 (valor inicial), 0, 2, 4 y 6.

Las ratas de control respondieron al 20 % de la pérdida de sangre con una caída de casi el 15 % en los niveles de glóbulos rojos en el día 0. Estos niveles se mantuvieron significativamente más bajos que los valores iniciales en los días 2 y 4, y no se habían recuperado completamente el día 6 (**figura 14**). Aunque las ratas tratadas con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc trajeron una caída casi idéntica en los niveles de glóbulos rojos después de una pérdida de sangre del 20 %, estas ratas trajeron una recuperación completa en dichos niveles en el día 2, seguido de una mayor elevación en los días 4 y 6, lo que representa una mejora muy significativa sobre los niveles de control en los puntos de tiempo correspondientes (**figura 14**). Se obtuvieron resultados similares para la concentración de hemoglobina. Estos hallazgos demuestran que una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado puede producir una recuperación más rápida de los niveles de glóbulos rojos de la anemia causada por una hemorragia aguda.

Ejemplo 17. Una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado aumenta los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos

Dos trampas de GDF, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, se evaluaron para determinar su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos en el mono cynomolgus. Los monos se trajeron por vía subcutánea con trampa de GDF (10 mg/kg; n = 4 machos/4 hembras) o vehículo (n = 2 machos/2 hembras) en los días 1 y 8. Se trajeron muestras de sangre en los días 1 (valor inicial del tratamiento previo), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron los niveles de glóbulos rojos (**figura 15**), el hematocrito (**figura 16**), los niveles de hemoglobina (**figura 17**), y los niveles de reticulocitos (**figura 18**). Los monos tratados con vehículo trajeron niveles reducidos de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en todos los puntos temporales posteriores al tratamiento, un efecto esperado de las muestras de sangre repetidas. Por el contrario, el tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumentó estos parámetros en el primer punto de tiempo posterior al tratamiento (día 3) y los mantuvo a niveles sustancialmente elevados durante la duración del estudio (**figuras 15-17**). Es importante destacar que los niveles de reticulocitos en monos tratados con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc trajeron sustancialmente en los días 8, 15 y 29 en comparación con el vehículo (**figura 18**). Este resultado demuestra que el tratamiento con trampa de GDF aumenta la producción de precursores de glóbulos rojos, lo que resulta en niveles elevados de glóbulos rojos.

En conjunto, estos datos demuestran que las trampas de GDF truncadas, así como las variantes de longitud completa, se pueden usar como antagonistas selectivos de GDF11 y ligandos potencialmente relacionados para aumentar la formación de glóbulos rojos *in vivo*.

5

Ejemplo 18. Trampa de GDF derivada de ActRIIB5

Otros han informado de una forma alternativa, soluble de ActRIIB (denominada ActRIIB5), en la que el exón 4, incluido el dominio transmembrana de ActRIIB, ha sido reemplazado por una secuencia C-terminal diferente (documento 10 W02007/053775).

La secuencia de ActRIIB5 humano nativo sin su líder es la siguiente:

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWIDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLGPAAHE
```

15

(SEQ ID NO: 36)

Se puede realizar una sustitución de leucina a aspartato u otras sustituciones ácidas en la posición nativa 79 (subrayada y resaltada) como se describe para construir la variante ActRIIB5 (L79D), que tiene la siguiente secuencia:

20

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLGPAAHE
```

(SEQ ID NO: 37)

25 Esta variante se puede conectar a un Fc humano con un enlazador TGGG para generar una proteína de fusión ActRIIB5 (L79D)-hFc humana con la siguiente secuencia:

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLGPAAHETGGGHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREGQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

30 (SEQ ID NO: 38)

Esta construcción puede expresarse en células CHO.

Ejemplo 19. Efectos en ratones de tratamiento combinado con EPO y una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado

La EPO induce la formación de glóbulos rojos al aumentar la proliferación de los precursores eritroides, mientras que las trampas de GDF podrían potencialmente afectar la formación de glóbulos rojos de manera que complementen o

mejoren los efectos de la EPO. Por lo tanto, los solicitantes investigaron el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los parámetros eritropoyéticos. A ratones C57BL/6 machos (9 semanas de edad) se les administró una sola inyección ip de EPO humana recombinante sola (epoetina alfa, 1800 unidades/kg), ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sola (10 mg/kg), ambas EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, o vehículo (solución salina tamponada 5 con Tris). Los ratones fueron sacrificados 72 h después de la dosificación para la recolección de sangre, bazos y fémures.

Los bazos y fémures se procesaron para obtener células precursoras de eritroides para el análisis de citometría de flujo. Despues de la extracción, el bazo se cortó en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero 10 bovino fetal al 5 % y se disoció mecánicamente empujando a través de un filtro de células de 70 µm con el émbolo de una jeringa estéril de 1 ml. Se limpian los fémures de cualquier músculo o tejido conectivo residual y se recortaron los extremos para permitir la extracción de la médula lavando el eje restante con el medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero fetal bovino al 5 % a través de una aguja de calibre 21 conectada a una jeringa de 3 ml. Las suspensiones celulares se centrifugaron (2000 rpm durante 10 min) y los sedimentos celulares se volvieron a 15 suspender en PBS que contenía suero fetal bovino al 5 %. Se incubaron células (10^6) con IgG anti-ratón para bloquear la unión no específica, luego se incubaron con anticuerpos marcados con fluorescencia contra los marcadores de superficie celular de ratón CD71 (receptor de transferrina) y Terl 19 (un antígeno asociado con glicoforina A de superficie celular), se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. Las células muertas en las muestras se excluyeron del análisis mediante la contratinación con

20 yoduro de propidio. La diferenciación eritroide en el bazo o la médula ósea se evaluó por el grado de marcación con CD71, que disminuye a lo largo del curso de la diferenciación, y la marcación con Terl19, que aumenta durante la diferenciación eritroide terminal que comienza con la etapa de proeritroblastos (Socolovsky y col., 2001, Blood 98:3261-3273; Ying y col., 2006, Blood 108:123-133). Por lo tanto, la citometría de flujo se utilizó para determinar el 25 número de proeritroblastos ($CD71^{alta}Terl 19^{baja}$), eritroblastos basófilos ($CD71^{alta}Terl 19^{alta}$), eritroblastos policromatófilos + ortocromatófilos ($CD71^{med}Terl 19^{alta}$) y eritroblastos ortocromatófilos tardíos + reticulocitos ($CD71^{baja}Terl 19^{alta}$), como se describe.

El tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc condujo a un aumento sorprendentemente vigoroso 30 de los glóbulos rojos. En el marco de tiempo de 72 horas de este experimento, ni EPO ni ActRIIB (L79D 25-131)-hFc solo aumentaron significativamente el hematocrito en comparación con el vehículo, mientras que el tratamiento combinado con los dos agentes condujo a un aumento de casi un 25 % en el hematocrito que fue inesperadamente sinérgicos, es decir, mayor que la suma de sus efectos separados (**figura 19**). La sinergia de este tipo generalmente 35 se considera una evidencia de que los agentes individuales están actuando a través de diferentes mecanismos celulares. También se observaron resultados similares para las concentraciones de hemoglobina (**figura 20**) y las concentraciones de glóbulos rojos (**figura 21**) cada uno de los cuales también se incrementó de forma sinérgica con el tratamiento combinado.

El análisis de los niveles de precursores eritroides puso de manifiesto un patrón más complejo. En el ratón, el bazo se 40 considera el órgano primario responsable de la eritropoyesis inducible ("estrés"). El análisis citométrico de flujo del tejido esplénico a las 72 h puso de manifiesto que la EPO alteró marcadamente el perfil del precursor eritropoyético en comparación con el vehículo, aumentando el número de eritroblastos basófilos en más del 170 % a expensas de los precursores tardíos (eritroblastos ortocromatófilos tardíos y reticulocitos), que disminuyeron en más de un tercio (**figura 22**). Es importante destacar que el tratamiento combinado aumentó significativamente los eritroblastos 45 basófilos en comparación con el vehículo, pero en menor medida que la EPO sola, al mismo tiempo que respalda la maduración de los precursores en etapa tardía (**figura 22**). Por lo tanto, el tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc incrementó la eritropoyesis mediante un aumento equilibrado de la proliferación y maduración de los precursores. En contraste con el bazo, el perfil de células precursoras en la médula ósea después del tratamiento combinado no difirió apreciablemente de aquel después de la EPO sola. Los solicitantes predicen a partir del perfil del 50 precursor esplénico que el tratamiento combinado conduciría a un aumento de los niveles de reticulocitos y estaría acompañado por una elevación sostenida de los niveles de glóbulos rojos maduros, si el experimento se extendiera más allá de 72 h.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que se puede administrar una trampa de GDF con un dominio extracelular 55 ActRIIB truncado en combinación con EPO para aumentar sinérgicamente la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Al actuar a través de un mecanismo complementario pero no definido, una trampa de GDF puede moderar el fuerte efecto proliferativo de un activador del receptor de la EPO solo y aún así permitir que se alcancen niveles objetivos de glóbulos rojos con dosis más bajas de un activador del receptor de la EPO, evitando así posibles efectos adversos u otros problemas asociados con niveles más altos de activación del receptor de EPO.

60 **Ejemplo 20. Una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado aumenta los niveles de RBC en**

un modelo de ratón del síndrome mielodisplásico

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos diversos de la insuficiencia de la médula ósea caracterizados clínicamente por citopenia periférica, anemia refractaria y riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda. La 5 transfusión de glóbulos rojos es una terapia de mantenimiento clave en MDS para aliviar la fatiga, mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia; sin embargo, las transfusiones regulares suelen producir una sobrecarga de hierro en estos pacientes, con efectos adversos sobre la morbilidad y la mortalidad que pueden llevar al uso de remedios tales como la terapia de quelación de hierro (Dreyfus, 2008, Blood Rev 22 Suppl 2: S29-34; Jabbour y col., 2009, Oncologist 14:489-496). Aunque la eritropoyetina recombinante (EPO) y sus derivados son un enfoque 10 terapéutico alternativo en un pequeño porcentaje de pacientes con MDS (Estey, 2003, Curr Opin Hematol 10:60-67), estudios recientes sugieren que esta clase de agentes está asociada con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad en algunas dosis debido a eventos tromboembólicos y crecimiento tumoral (Krapf y col., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Por lo tanto, existe la necesidad de una terapia MDS alternativa que aumentaría los niveles de RBC sin la sobrecarga de hierro que acompaña a las transfusiones crónicas o los 15 riesgos inherentes a la EPO exógena y sus derivados.

Por lo tanto, los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los niveles de RBC en un modelo de ratón transgénico que recapitula las características clave de MDS, incluida la transformación a leucemia aguda (Lin y col., 2005, Blood 106:287- 295; Beachy y col., 2010, Hematol Oncol Clin North Am 24:361-375). A partir de los tres 20 meses de edad, los ratones machos y hembras NUP98-HOXD13 se trajeron dos veces por semana con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, sc) o vehículo (TBS). A los compañeros de camada de tipo natural se les administró ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc o vehículo y se utilizaron como controles. Las muestras de sangre se recogieron antes del inicio de la dosificación y, posteriormente, a intervalos mensuales para realizar mediciones de RSC.

25 Se observaron varias diferencias al inicio del estudio entre los ratones NUP98-HOXD13 y los controles de tipo natural. Específicamente, los ratones NUP98-HOXD13 macho mostraron una disminución significativa en las concentraciones de RBC (-8,8 %, p <0,05) y el hematocrito (-8,4 %, p <0,05) en comparación con los ratones de tipo natural, y los ratones hembra NUP98-HOXD13 mostraron tendencias similares. Los resultados después de tres meses de dosificación (media ± desviación estándar) se muestran en la siguiente tabla.

30

| Ratones NUP98-HOXD13 | | Conc. de RBC (10^{12} células/l) | Conc. de hemoglobina (g/dl) | Hematocrito (%) |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Macho | Vehículo (n = 6) | 6,56 ±0,51 | 10,68 ±0,68 | 31,83 ±2,13 |
| | ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc (n=8) | 8,65 ± 0,54*** | 13,54 ± 0,91*** | 39,20 ± 2,82*** |
| Hembra | Vehículo (n = 5) | 6,38 ± 1,61 | 10,30 ±2,58 | 31,96 ±8,73 |
| | ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc (n = 6) | 8,52 ±0,70* | 13,52 ±0,56* | 42,23 ±2,53 † |

*** p <0,001 frente a macho + vehículo
 * p <0,05 frente a macho + vehículo
 † p = 0,056 frente a hembra + vehículo

En comparación con el vehículo, el tratamiento con ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc durante tres meses aumentó las concentraciones de RBC y la concentración de hemoglobina significativamente (aproximadamente en un 30 %) en 35 ratones NUP98-HOXD13 tanto machos como hembras. El hematocrito también aumentó significativamente en estos ratones machos y aumentó con una tendencia hacia la importancia en los ratones hembras. Por lo tanto, una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado puede aumentar significativamente los niveles de RBC en un modelo murino de MDS. Mientras que las transfusiones son inherentemente una fuente de hierro exógeno, una trampa

de GDF eleva los niveles de RBC al promover el uso de reservas de hierro endógeno a través de la eritropoyesis, evitando así la sobrecarga de hierro y sus consecuencias negativas. Además, como se indica en el ejemplo 19, una trampa de GDF actúa a través de un mecanismo celular diferente (aunque complementario) que el usado por activadores del receptor de la EPO para estimular la eritropoyesis, y así evita los posibles efectos adversos asociados con la activación del receptor de la EPO.

Ejemplo 21. Efecto de una trampa de GDF con un dominio extracelular ActRIIB truncado en la morfología y los niveles de RBC en un modelo de ratón de la β-talasemia

- 10 En los síndromes de talasemia, que representan las causas más comunes de eritropoyesis inefectiva, los desequilibrios en la expresión de las cadenas de globina α y β causan anemia debido al aumento de la apoptosis durante la maduración del eritroblasto. La transfusión de RBC es actualmente una terapia de mantenimiento clave en la talasemia, pero con el tiempo causa una acumulación de hierro potencialmente letal en determinados tejidos (Tanno y col 2010, Adv Hematol 2010:358283). Por ejemplo, la enfermedad cardíaca asociada con la sobrecarga de hierro 15 puede representar el 50 % de la mortalidad en pacientes con talasemia mayor (Borgna-Pignatti y col, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47). Es importante destacar que los niveles de EPO endógenos suelen ser elevados y contribuyen a la etiología de la enfermedad en los síndromes de talasemia, así como a otros trastornos de la eritropoyesis inefectiva; por lo tanto, el uso terapéutico de EPO recombinante puede ser inadecuado. Por lo tanto, existe la necesidad de terapias alternativas para la talasemia y otros trastornos de la eritropoyesis inefectiva que aumenten los 20 niveles de RBC sin la sobrecarga de hierro que acompaña a las transfusiones crónicas.

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc en la formación de RBC en un modelo de ratón de la β-talasemia intermedia en el que se ha eliminado toda la región codificante del gen de codificación de la β-globina mayor. Los ratones homocigotos para este alelo Hbb^{th-1} muestran una anemia micocítica hipocromática con cuerpos 25 de inclusión en una alta proporción de glóbulos rojos circulantes (Skow y col, 1983, Cell 1043:1043-1052). En un experimento preliminar, los ratones $Hbb^{-/-}$ β- talasémicos (C57BL/6J- Hbb^{d3th}/J) a los 2-5 meses de edad fueron asignados al azar para recibir ActRIIB (L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg) o vehículo (solución salina tamponada con Tris) por inyección subcutánea dos veces por semana. Los compañeros de camada de tipo natural administrados con vehículo sirvieron como controles adicionales. Las muestras de sangre (100 μ l) se recogieron mediante sangrado de 30 mejillas antes del inicio de la dosificación y, posteriormente, a intervalos regulares para el análisis de RSC. La caracterización de los parámetros hematológicos al inicio del estudio confirmó que los ratones $Hbb^{-/-}$ β- talasémicos estaban gravemente anémicos (**figura 23**), y el tratamiento de ratones $Hbb^{-/-}$ con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 4 semanas aumentó el número de RBC marcadamente en comparación con los ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo, reduciendo así la anemia observada modelo a la mitad (**figura 24**). También se observaron aumentos asociados con 35 el tratamiento en el hematocrito y la concentración de hemoglobina. Es importante destacar que el tratamiento de los ratones $Hbb^{-/-}$ con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc también dio como resultado una mejor morfología de los RBC y una reducción de la hemólisis y los residuos eritrocíticos en comparación con los ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo (**figura 25**), lo que indica una mejora fundamental en la eritropoyesis. Por lo tanto, un polipéptido de la trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado puede proporcionar un beneficio terapéutico para la anemia en un modelo 40 murino de la β-talasemia al aumentar tanto el número de RBC como la morfología. Al promover la maduración de los eritroblastos y al mismo tiempo reducir la anemia, los polipéptidos de la trampa de GDF pueden tratar la eritropoyesis inefectiva. A diferencia de las transfusiones, que son inherentemente una fuente de hierro exógeno, un polipéptido de la trampa de GDF puede elevar los niveles de RBC promoviendo el uso de reservas de hierro endógeno a través de la eritropoyesis, evitando así la sobrecarga de hierro y sus consecuencias negativas.

Ejemplo 22. Efecto de una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado en los niveles de EPO, esplenomegalia, densidad ósea y sobrecarga de hierro en un modelo de ratón de la β-talasemia

La hipoxia asociada con eritropoyesis inefectiva causa niveles elevados de EPO que pueden conducir a la expansión 50 masiva de eritroblastos tanto dentro como fuera de la médula ósea, lo que lleva a la esplenomegalia (agrandamiento del bazo), patología ósea inducida por eritroblastos y sobrecarga de hierro en el tejido, incluso en ausencia de transfusiones de RBC terapéuticos. La sobrecarga de hierro no tratada conduce a la deposición de hierro en los tejidos, disfunción orgánica múltiple y mortalidad prematura (Borgna-Pignatti y col., 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47; Borgna-Pignatti y col., 2011, Expert Rev Hematol 4:353-366), la mayoría de las veces se debe a cardiomiopatía en 55 formas graves de talasemia (Lekawanvijit y col., 2009, Can J. Cardiol 25: 213-218). Al aumentar la efectividad eritropoyética, un polipéptido de la trampa de GDF puede aliviar no solo la anemia subyacente y los niveles elevados de EPO, sino también las complicaciones asociadas de la esplenomegalia, la patología ósea y la sobrecarga de hierro.

Los solicitantes investigaron los efectos de un polipéptido de la trampa de GDF en estos parámetros en el mismo 60 modelo de ratón de la β-talasemia intermedia estudiado en el ejemplo 21. Los ratones $Hbb^{-/-}$ β-talasémicos (C57BL/6J- Hbb^{d3th}/J) a los 3 meses de edad fueron asignados al azar para recibir ActRIIB (L79D 25-131)-mFc (1 mg/kg, n = 7) o

vehículo (solución salina tamponada con Tris, n =7) por inyección subcutánea dos veces por semana durante 2 meses. Los compañeros de camada de tipo natural administrados con vehículo (n =13) sirvieron como controles adicionales. Se recogieron muestras de sangre (100 µl) al finalizar el estudio para el análisis de RSC. Al finalizar el estudio, la densidad mineral ósea se determinó mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA), los niveles séricos 5 de EPO se determinaron mediante ELISA, las especies reactivas de oxígeno (ROS) se cuantificaron con 2',7'-dclorodihidrofluoresceína diacetato y citometría de flujo (Suragani y col., 2012, Blood 119:5276-5284), y los niveles de ARNm de hepcidina se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Este polipéptido de la trampa de GDF ejerció múltiples efectos hematológicos consistentes con el alivio de la 10 eritropoyesis inefectiva. El tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* β-talasémicos con ActRIIB(L79D 25- 131)-mFc durante 2 meses aumentó los recuentos de glóbulos rojos en un 25 % en comparación con los ratones *Hbb^{-/-}* administrados con vehículo (figura 26). En los ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-13 I)-mFc también aumentó la concentración de hemoglobina y el hematocrito significativamente a los 2 meses en comparación con los controles del vehículo. Estos cambios fueron acompañados por niveles reducidos de reticulocitos circulantes (31,3 ± 2,3 % frente a 15 44,8 ± 5,0 % para ratones *Hbb^{-/-}* tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc o vehículo, respectivamente), que es consistente con el alivio de la anemia. Como en el ejemplo 21, el tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB(L79D 25- 13 I)-mFc dio como resultado una mejor morfología de los RBC y una reducción de los residuos eritrocíticos en comparación con los ratones *Hbb^{-/-}* administrados con vehículo. En comparación con los individuos sanos, los pacientes con talasemia muestran una mayor tasa de destrucción de RBC y niveles séricos elevados de bilirrubina, 20 que es un producto del catabolismo del hemo y marcador de hemólisis (Orten, 1971, Ann Clin Lab Sci 1:113-124). En los ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-13 I)-mFc redujo los niveles de bilirrubina en suero a los 2 meses en casi la mitad en comparación con el vehículo (figura 27), proporcionando así evidencia de que ActRIIB(L79D 25- 131)-mFc puede mejorar inesperadamente la integridad estructural/funcional de los RBC maduros, ya que promueve la formación de RBC. Es importante destacar que el tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB (L79D 25-131)-mFc 25 redujo los niveles de EPO en suero a los 2 meses en más del 60 % en comparación con el vehículo en el mismo modelo (figura 28). Dado que los niveles elevados de EPO son un sello de eritropoyesis inefectiva en la β-talasemia, la reducción de tales niveles en este caso es una fuerte evidencia de que ActRIIB (L79D 25-131)-mFc alivia la eritropoyesis inefectiva, no solo la anemia que causa, en este modelo murino de la talasemia.

30 Este polipéptido de la trampa de GDF también produjo cambios beneficiosos en los criterios de evaluación que representan las principales complicaciones de la eritropoyesis inefectiva. En los pacientes con talasemia, tanto la esplenomegalia como el deterioro óseo son causados por hiperplasia eritroide estimulada por EPO y eritropoyesis extramedular. En los ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-13 I)-mFc durante 2 meses redujo el peso del bazo significativamente en comparación con el vehículo (figura 29) y la densidad mineral ósea completamente 35 restaurada a valores de tipo natural (figura 30). La homeostasis del hierro también se mejoró significativamente por el tratamiento con este polipéptido de la trampa de GDF. El hierro sérico consiste en hierro no unido (libre) y hierro unido a apotransferina (formando transferina), una proteína especializada para el transporte de hierro elemental en la circulación. El hierro sérico constituye un componente relativamente pequeño y lábil del hierro corporal total, mientras que los niveles séricos de ferritina, otra forma de almacenamiento de hierro que se encuentra principalmente 40 intracelularmente, representan un componente más grande y menos lábil. Una tercera medida de la carga de hierro es la saturación de transferina, el grado en que la capacidad de unión de hierro de la transferina está ocupada. En los ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-13 I)-mFc durante 2 meses redujo significativamente cada uno de estos indicadores de sobrecarga de hierro en comparación con el vehículo (figura 31). Además de sus efectos en estos diversos parámetros de la homeostasis del hierro, ActRIIB (L79D 25-131)-mFc normalizó la sobrecarga de hierro 45 tisular en ratones *Hbb^{-/-}* según lo determinado por el análisis histoquímico en el bazo, el hígado y el riñón (figura 32). Además, este polipéptido de la trampa de GDF ejerció un efecto beneficioso sobre la expresión de hepcidina, una proteína hepática considerada como el regulador principal de la homeostasis del hierro (Gantz, 2011, Blood 117: 4425- 4433), cuyos niveles varían inversamente con la absorción de hierro en la dieta. El tratamiento con ActRIIB (L79D 25- 131)-mFc revirtió la expresión anormalmente baja de hepcidina en el hígado de ratones *Hbb^{-/-}* (figura 33). Finalmente, 50 se realizó otro estudio con un diseño similar para determinar el efecto de esta trampa de GDF en las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se cree que median muchos de los efectos tóxicos de la sobrecarga de hierro (Rund y col., 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). En los ratones *Hbb^{-/-}* de 3 meses de edad, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25- 13 I)-mFc a 1 mg/kg dos veces a la semana durante 2 meses, los niveles de ROS (figura 34) casi normalizó los niveles ROS (figura 34) y por lo tanto se predice que reduciría en gran medida el daño tisular mediado por ROS en la talasemia 55 y otras enfermedades caracterizadas por una eritropoyesis inefectiva.

En conjunto, los hallazgos anteriores demuestran que los polipéptidos de la trampa de GDF pueden tratar la eritropoyesis inefectiva, incluida la anemia y los niveles elevados de EPO, así como las complicaciones tales como la esplenomegalia, la patología ósea inducida por eritroblastos, la sobrecarga de hierro y sus patologías asociadas. Con 60 la esplenomegalia, tales patologías incluyen dolor torácico o abdominal e hiperplasia reticuloendotelial. La hematopoyesis extramedular puede producirse no solo en el bazo sino potencialmente en otros tejidos en forma de

pseudotumores hematopoyéticos extramedulares (Musallam y col., 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). Con la patología ósea inducida por eritroblastos, las patologías asociadas incluyen baja densidad mineral ósea, osteoporosis y dolor óseo (Haidar y col., 2011, Bone 48:425-432). Con sobrecarga de hierro, las patologías asociadas incluyen la supresión de hepcidina y la hiperabsorción de hierro en la dieta (Musallam y col., 2012, Blood Rev 26 5 (Suppl 1):S16-S19), endocrinopatías múltiples y fibrosis hepática/cirrosis (Galanello y col., 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), y la cardiomielitis por sobrecarga de hierro (Lekawannijit y col., 2009, Can J Cardiol 25:213218). En contraste con las terapias existentes para la eritropoyesis inefectiva, los polipéptidos de la trampa de GDF, tales como ActRIIB (L79D 25-13 1)-mFc, son capaces de reducir la sobrecarga de hierro en modelos murinos al mismo tiempo que aumenta los niveles de RBC. Esta novedosa capacidad distingue a los polipéptidos de la trampa de GDF de las 10 transfusiones de sangre, que inherentemente cargan al cuerpo con hierro exógeno en el curso del tratamiento de la anemia y lo hacen sin aliviar la afección subyacente de la eritropoyesis inefectiva.

Si bien se han explicado realizaciones específicas de la materia, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de esta memoria 15 descriptiva y las siguientes reivindicaciones. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones.

ES 2 741 477 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Acceleron Pharma Inc.

5 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR LA ERITROPOYESIS INEFECTIVA

<130> P42855EP-PCT

<140> EP12842601.2

10 <141> 17/10/2012

<150> 61/547.932

<151> 17/10/2011

15 <160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25

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

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

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

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

ES 2 741 477 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 741 477 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105 110

10 Ala Pro Thr
115

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

ES 2 741 477 T3

<400> 3

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala
 100

5

<210> 4
 <211> 1539
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4

| | |
|---|-----|
| atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg | 60 |
| cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcatt tactacaacg ccaactggga gctggagcgc | 120 |
| accaaccaga gcccccttggaa gcgcgtcgaa ggcgagcagg acaaggcgct gcactgctac | 180 |
| gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggttg ctggcttagat | 240 |
| gacttcaact gctacgatacg gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac | 300 |
| ttctgtgtat gtgaaggcaa cttctgcaac gagegcttca ctcatttgc agaggctggg | 360 |
| ggcccccgaag tcacgtacga gccacccccc acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc | 420 |
| tactcactgc tgccccatcgg gggccttcc ctcatcgtcc tgctggccctt ttggatgtac | 480 |
| cggcatcgca agcccccccta cggcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca | 540 |
| ccatccccctc tggtggccct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggccgc | 600 |
| tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatctccca | 660 |

ES 2 741 477 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| ctccaggaca | agcagtcgtg | gcagagtcaa | cgggagatct | tcagcacacc | tggcatgaag | 720 |
| cacgagaacc | tgctacagtt | cattgctgcc | gagaagcgag | gctccaacct | cgaagtagag | 780 |
| ctgtggctca | tcacggcctt | ccatgacaag | ggctccctca | cggattacct | caaggggaac | 840 |
| atcatcacat | ggaacgaact | gtgtcatgta | gcagagacga | tgtcacgagg | cctctcatac | 900 |
| ctgcatgagg | atgtgccctg | gtgccgtggc | gagggccaca | agccgtctat | tgcccacagg | 960 |
| gactttaaaa | gtaagaatgt | attgctgaag | agcgacctca | cagccgtgct | ggctgacttt | 1020 |
| ggcttggctg | ttcgatttga | gccagggaaa | cctccagggg | acacccacgg | acaggttaggc | 1080 |
| acgagacggt | acatggctcc | tgaggtgctc | gagggagcca | tcaacttcca | gagagatgcc | 1140 |
| ttcctgcgca | ttgacatgta | tgccatgggg | ttggtgctgt | gggagcttgt | gtctcgctgc | 1200 |
| aaggctgcag | acggaccctgt | ggatgagttac | atgctgccct | ttgaggaaga | gattggccag | 1260 |
| cacccttcgt | tggaggagct | gcaggaggtg | gtggtgccaca | agaagatgag | gcccaccatt | 1320 |
| aaagatcaact | ggttgaaaaca | cccgccctg | gcccaagctt | gtgtgaccat | cgaggagtgc | 1380 |
| tgggaccatg | atgcagaggc | tcgcttgc | gccccgtgt | tggaggagcg | ggtgtccctg | 1440 |
| attcggaggt | cggtcaacgg | cactacctcg | gactgtctcg | tttccctgg | gacctctgtc | 1500 |
| accaatgtgg | acctgcccccc | taaagagtca | agcatctaa | | | 1539 |

<210> 5

<211> 345

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| gggcgtgggg | aggctgagac | acgggagtgc | atctactaca | acgccaactg | ggagctggag | 60 |
| cgcaccaacc | agagcggcct | ggagcgctgc | gaaggcgagc | aggacaagcg | gctgcactgc | 120 |
| tacgcctcct | gggccaacag | ctctggcacc | atcgagctcg | tgaagaaggg | ctgctggcta | 180 |
| gatgacttca | actgctacga | taggcaggag | tgtgtggcca | ctgaggagaa | cccccagggtg | 240 |
| tacttctgt | gctgtgaagg | caacttctgc | aacgagcgct | tcactcattt | gccagaggct | 300 |
| 10 | gggggccccgg | aagtcacgta | cgagccaccc | ccgacagccc | ccacc | 345 |

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

20 <220>

<221> variante

<222> (43)..(43)

<223> puede ser Ala

25 <220>

<221> variante

ES 2 741 477 T3

<222> (100)..(100)
<223> puede ser Ala

<220>
5 <221> variante
<222> (212)..(212)
<223> puede ser Ala

<400> 6

10

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205

ES 2 741 477 T3

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

Lys
225

<210> 7

<211> 343

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 7

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105 110

Ala Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130 135 140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
165 170 175

ES 2 741 477 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
195 200 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
210 215 220

Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 8

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: Péptido de melitina de miel de abeja

10

<400> 8

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

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

15 <210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: Péptido activador del plasminógeno tisular

<400> 9

5

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Met | Asp | Ala | Met | Lys | Arg | Gly | Leu | Cys | Cys | Val | Leu | Leu | Leu | Cys | Gly | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | Ala | Val | Phe | Val | Ser | Pro | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 10

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: Péptido líder nativo

15

<400> 10

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

| | | |
|-----|-----|-----|
| Ala | Gly | Ser |
|-----|-----|-----|

20 <210> 11

<211> 368

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>

<221> variante

30 <222> (251)..(251)

<223> puede ser Ala

<400> 11

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Ala | Met | Lys | Arg | Gly | Leu | Cys | Cys | Val | Leu | Leu | Leu | Cys | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| Ala | Val | Phe | Val | Ser | Pro | Gly | Ala | Ser | Gly | Arg | Gly | Glu | Ala | Glu | Thr | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 20 | 25 | 30 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| Arg | Glu | Cys | Ile | Tyr | Tyr | Asn | Ala | Asn | Trp | Glu | Leu | Glu | Arg | Thr | Asn | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 40 | 45 | | | | | | |

35

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| Gln | Ser | Gly | Leu | Glu | Arg | Cys | Glu | Gly | Glu | Gln | Asp | Lys | Arg | Leu | His | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 50 | 55 | 60 | | | | | | |

ES 2 741 477 T3

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

Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
85 90 95

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

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
115 120 125

Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
130 135 140

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
145 150 155 160

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
165 170 175

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
180 185 190

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
195 200 205

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
210 215 220

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
225 230 235 240

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
245 250 255

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
260 265 270

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
275 280 285

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
290 295 300

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
305 310 315 320

ES 2 741 477 T3

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
340 345 350

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 12

<211> 1107

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia polinucleotídica

10

<400> 12

| | |
|--|------|
| atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tggctggagc agtcttcgtt | 60 |
| tcgccccggcg cctctggcg tggggaggct gagacacggg agtgcatact a ctacaacgccc | 120 |
| aactgggagc tggagcgac caaccagagc ggcctggagc gctgcaagg cgagcaggac | 180 |
| aaggcgctgc actgctacgc ctccctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag | 240 |
| aagggctgct gggacgatga cttcaactgc tacgatagggc aggagtgtgt ggccactgag | 300 |
| gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact | 360 |
| catttgccag aggctggggg cccggaaagtc acgtacgagc caccggcggac agccccccacc | 420 |
| ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca | 480 |
| gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgagggtc | 540 |
| acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg | 600 |
| gacggcgctgg aggtgcataa tgccaagaca aagccggggg aggagcagta caacagcacg | 660 |
| taccgtgtgg tcagcgtcct cacccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac | 720 |
| aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gtccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc | 780 |
| aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc | 840 |
| aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg | 900 |
| gagttggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac | 960 |
| tccgacggct cttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag | 1020 |
| ggggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag | 1080 |
| agcctctccc tgtatccggg taaatga | 1107 |

15 <210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 13

Thr Gly Gly Gly Gly

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 15

20 <211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

25

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Leu | Gly | Arg | Ser | Glu | Thr | Gln | Glu | Cys | Leu | Phe | Phe | Asn | Ala | Asn |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Tyr | Asp | Arg | Thr | Asp | Cys | Val | Glu | Lys | Lys | Asp | Ser | Pro | Glu | Val |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Glu | Met | Glu | Val | Thr | Gln | Pro | Thr | Ser | Asn | Pro | Val | Thr | Pro |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | |

Lys Pro Pro Thr

115

30 <210> 16

<211> 150

<212> PRT

ES 2 741 477 T3

<213> Rattus sp.

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

5 Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 17

<211> 150

<212> PRT

10 <213> Sus sp.

<400> 17

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

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

15

ES 2 741 477 T3

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 18

<211> 150

5 <212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 18

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

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

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

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

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

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

10 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg

ES 2 741 477 T3

100

105

110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 19

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

10 Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 20

<211> 150

<212> PRT

15 <213> Bos sp.

ES 2 741 477 T3

<400> 20

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Ala | Pro | Trp | Ala | Ala | Leu | Ala | Leu | Leu | Trp | Gly | Ser | Leu | Cys |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Gly | Ser | Gly | Arg | Gly | Glu | Ala | Glu | Thr | Arg | Glu | Cys | Ile | Tyr | Tyr |
| | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Ala | Asn | Trp | Glu | Leu | Glu | Arg | Thr | Asn | Gln | Ser | Gly | Leu | Glu | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cys | Glu | Gly | Glu | Arg | Asp | Lys | Arg | Leu | His | Cys | Tyr | Ala | Ser | Trp | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | | 60 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Ser | Ser | Gly | Thr | Ile | Glu | Leu | Val | Lys | Lys | Gly | Cys | Trp | Leu | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Phe | Asn | Cys | Tyr | Asp | Arg | Gln | Glu | Cys | Val | Ala | Thr | Glu | Glu | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | | | 95 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Gln | Val | Tyr | Phe | Cys | Cys | Cys | Glu | Gly | Asn | Phe | Cys | Asn | Glu | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | | 110 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Thr | His | Leu | Pro | Glu | Ala | Gly | Gly | Pro | Glu | Val | Thr | Tyr | Glu | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | | 125 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Pro | Thr | Ala | Pro | Thr | Leu | Leu | Thr | Val | Leu | Ala | Tyr | Ser | Leu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | 140 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Val | Gly | Gly | Leu | Ser | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 145 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 145 | | | | | | | | | | | | | | | |

5 <210> 21
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Xenopus sp.

10 <400> 21

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Ala | Ser | Val | Ala | Leu | Thr | Phe | Leu | Leu | Leu | Leu | Ala | Thr | Phe |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arg | Ala | Gly | Ser | Gly | His | Asp | Glu | Val | Glu | Thr | Arg | Glu | Cys | Ile | Tyr |
| | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Asn | Ala | Asn | Trp | Glu | Leu | Glu | Lys | Thr | Asn | Gln | Ser | Gly | Val | Glu |
| | | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arg | Leu | Val | Glu | Gly | Lys | Lys | Asp | Lys | Arg | Leu | His | Cys | Tyr | Ala | Ser |

ES 2 741 477 T3

50

55

60

Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
 85 90 95

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

Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro
 115 120 125

Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro
 130 135 140

Ile Val Gly Leu Ser Met
 145 150

<210> 22

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
 20 25 30

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
 35 40 45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
 50 55 60

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

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
 85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
 100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
 115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile
145 150

<210> 23

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido de consenso sintético

10

<220>

<221> variante

<222> (8)..(8)

<223> puede ser Ala o no presente

15

<220>

<221> variante

<222> (121)..(121)

<223> puede ser Ala, Val o Met

20

<400> 23

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Ala | Pro | Trp | Ala | Ala | Thr | Leu | Ala | Leu | Leu | Trp | Gly | Ser | Leu |
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

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

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

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

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

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

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

Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 115 120 125

Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
145 150

<210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Etiqueta 6xHis sintética

10 <400> 24

| His | His | His | His | His | His |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | | | | 5 | |

<210> 25
 15 <211> 1107
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 25

| | |
|---|------|
| atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt | 60 |
| tgcggccggcg cctctggcg tggggaggct gagacacggg agtgcacatcta ctacaacgcc | 120 |
| aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac | 180 |
| aagcggctgc actgctacgc ctccctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag | 240 |
| aagggtctgtt gggatgtatca cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag | 300 |
| gagaaccccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact | 360 |
| catttgccag aggtgggggg cccggaaatgc acgtacgagc caccccccac agccccccacc | 420 |
| ggtgttgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca | 480 |
| gttttccctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc | 540 |
| acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaatgt | 600 |
| gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg | 660 |
| taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac | 720 |
| aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc | 780 |
| aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc | 840 |
| aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcggcgtg | 900 |
| gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac | 960 |
| 25 tccgacggct ctttcttcctt ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag | 1020 |
| gggaacgtct tctcatgttc cgtgatgtcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag | 1080 |
| agccatctccc tgtccccggg taaatga | 1107 |

<210> 26
 <211> 360

ES 2 741 477 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu
115 120 125

Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

10

ES 2 741 477 T3

180

185

190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr |
| 290 | | | | | | 295 | | | | | | 300 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 27

<211> 1083

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<220>

<221> mat_péptido

<222> (76)..(396)

15 <400> 27

atggatgcaa tgaagagagg gctctgttgt gtgtctgtgc tttgtggagc agtcttcgtt

60

ES 2 741 477 T3

| | |
|--|--|
| tcgccccggcg ccgct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp 1 5 10 | 111 |
| gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu 15 20 25 | 159 |
| cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly 30 35 40 | 207 |
| acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg gac gat gac ttc aac tgc Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys 45 50 55 60 | 255 |
| tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr 65 70 75 | 303 |
| ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu 80 85 90 | 351 |
| cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccc aca Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr 95 100 105 | 396 |
| ggtgtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttccctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccgaa ggagatgacc aagaaccagg tcagcgtgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgcgtgc gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttttccct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtccccggg taaatga | 456 516 576 636 696 756 816 876 936 996 1056 1083 |

<210> 28

<211> 335

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 28

ES 2 741 477 T3

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30

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

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His
100 105 110

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
130 135 140

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
210 215 220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
225 230 235 240

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
245 250 255

ES 2 741 477 T3

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
260 265 270

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330 335

<210> 29

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 29

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30

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

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105

15 <210> 30

<211> 1083

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>

ES 2 741 477 T3

<221> mat_péptido
 <222> (76)..(396)

<400> 30

| | | |
|---|---|------|
| 5 | atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt | 60 |
| | tcgccccggcg cccgcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp 1 5 10 | 111 |
| | gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu 15 20 25 | 159 |
| | cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly 30 35 40 | 207 |
| | acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg gac gac gat ttc aat tgt Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys 45 50 55 60 | 255 |
| | tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr 65 70 75 | 303 |
| | ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu 80 85 90 | 351 |
| | ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr 95 100 105 | 396 |
| | ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca | 456 |
| | gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc | 516 |
| | acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg | 576 |
| | gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg | 636 |
| | taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctaatgg caaggagtag | 696 |
| | aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc | 756 |
| | aaagggcagg cccgagaacc acagggtac accctgcccc catccggga ggagatgacc | 816 |
| | aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggctct atcccagcga catcgccgtg | 876 |
| | gagtggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac | 936 |
| | tccgacggct ctttttcctt ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag | 996 |
| | gggaacgtct tctcatgtc cgtgtatgtcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag | 1056 |
| | agccatctccc tgtccccggg taaatga | 1083 |

10 <210> 31

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

ES 2 741 477 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 31

| | |
|---|-----|
| gaaacccgcg aatgtattta ttacaatgct aattgggaac tcgaacggac gaaccaatcc | 60 |
| gggctcgAAC ggtgtgaggg ggaacaggat aaacgcctcc attgctatgc gtcgtggagg | 120 |
| aactcctccg ggacgattga actggtaaag aaagggtgct gggacgacga tttcaattgt | 180 |
| tatgaccGCC aggaatgtgt cgcgaccGAA gagaatCCGc aggtctattt ctgttgtgc | 240 |
| gagggGAATT tctgttatGA acggTTacc cacTccccG aAGCCGGCGG gcccGAGGTG | 300 |
| 5 acctatGAAC cccCGCCcAC C | 321 |

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

15 <400> 32

| | |
|---|--|
| Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn | |
| 1 5 10 15 | |
| Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly | |
| 20 25 30 | |
| Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser | |
| 35 40 45 | |
| Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn | |
| 50 55 60 | |
| Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val | |
| 65 70 75 80 | |
| Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His | |
| 85 90 95 | |
| Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr | |
| 100 105 110 | |
| Ala Pro Thr | |
| 115 | |

20

<210> 33

<211> 1107

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 741 477 T3

<400> 33

| | |
|--|------|
| tcatttaccc ggggacaggg agaggcttt ctgcgtgtag tggttgtgca gagcctcatg | 60 |
| catcacggag catgagaaga cgccccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt | 120 |
| gctatagagg aagaaggagc cgtcgagtc cagcacggga ggcgtggct tgttagttgtt | 180 |
| ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctggataga agccttgac | 240 |
| caggcaggta aggctgacct gtttttgtt catctctcc cgggatgggg gcagggtgta | 300 |
| cacctgtggt ttcggggct gcccttggc tttggagatg gtttctcga tgggggctgg | 360 |
| gagggcttg ttggagacct tgcacttgta ctccctgcca ttcaagccagt cctgggtcag | 420 |
| gacggtgagg acgctgacca cacggtaagt gctgttgac tgctccccc ggggcttgc | 480 |
| cttggcatta tgcaccccca cgcgcgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggttttc | 540 |
| gtggctcact tccaccacca cgcgcgtgac ctcaagggtc cgggagatca tgagggtgtc | 600 |
| cttgggtttt gggggaaaga ggaagactga cgggtccccc aggagttcag gtgctggca | 660 |
| cgggtggcat gtgtgagttt caccacgggt gggggctgtc ggggggtggct cgtacgtgac | 720 |
| ttccggggccc ccagcctctg gcaaatttgcgtt gaagcgctcg ttgcagaagt tgcccttcaca | 780 |
| gcagcagaag tacacctggg gtttttttttcc agtggccaca cactcctgca tatcgttagca | 840 |
| gttgaagtca tcatcccagc agcccttctt cacgagctcg atgggtccag agctgttgcg | 900 |
| ccaggaggcg tagcagtgcg gcccgttgcg ctgtctgcct tcgcagcgct ccaggccgct | 960 |
| ctgggtggtg cgctccagct cccagttggc gttgttagtag atgcactccc gtgtctcagc | 1020 |
| ctccccacgc ccagaggcgcc cgggcgaaac gaagactgct ccacacagca gcagcacacaca | 1080 |
| gcagagccct cttttattt catccat | 1107 |

5 <210> 34
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 34

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| tcatttaccc | ggggacaggg | agaggctt | ctgcgttag | tggtttgca | gaggcctatg | 60 |
| catcacggag | catgagaaga | cgttccctg | ctgccacctg | ctcttgc | cggtgagctt | 120 |
| gctatagagg | aagaaggagc | cgtcgagtc | cagcacggga | ggcgtggct | tgtagttgtt | 180 |
| ctccggctgc | ccattgctct | cccactccac | ggcgatgtcg | ctgggataga | agcctttgac | 240 |
| caggcagg | tc | aggctgac | ggttcttgg | catctcc | cggatgggg | 300 |
| cac | ctgtgg | tctcg | cccc | tttgg | gatgt | 360 |
| gaggg | ttt | gg | gg | gg | gg | 420 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 480 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 540 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 600 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 660 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 720 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 780 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 840 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 900 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 960 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 1020 |
| ttt | gg | gg | gg | gg | gg | 1080 |
| cat | | | | | | 1083 |

<210> 35

<211> 1083

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10 <400> 35

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| tcatttaccc | ggggacaggg | agaggctt | ctgcgttag | tggtttgca | gaggcctatg | 60 |
| catcacggag | catgagaaga | cgttccctg | ctgccacctg | ctcttgc | cggtgagctt | 120 |
| gctatagagg | aagaaggagc | cgtcgagtc | cagcacggga | ggcgtggct | tgtagttgtt | 180 |
| ctccggctgc | ccattgctct | cccactccac | ggcgatgtcg | ctgggataga | agcctttgac | 240 |
| caggcagg | tc | aggctgac | ggttcttgg | catctcc | cggatgggg | 300 |
| cac | ctgtgg | tctcg | cccc | tttgg | gatgt | 360 |

ES 2 741 477 T3

<210> 37
 <211> 141
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 37

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Gly | Glu | Ala | Glu | Thr | Arg | Glu | Cys | Ile | Tyr | Tyr | Asn | Ala | Asn |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Glu | Leu | Glu | Arg | Thr | Asn | Gln | Ser | Gly | Leu | Glu | Arg | Cys | Glu | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gln | Asp | Lys | Arg | Leu | His | Cys | Tyr | Ala | Ser | Trp | Arg | Asn | Ser | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | 45 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Ile | Glu | Leu | Val | Lys | Lys | Gly | Cys | Trp | Asp | Asp | Asp | Phe | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | 60 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Tyr | Asp | Arg | Gln | Glu | Cys | Val | Ala | Thr | Glu | Glu | Asn | Pro | Gln | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Phe | Cys | Cys | Cys | Glu | Gly | Asn | Phe | Cys | Asn | Glu | Arg | Phe | Thr | His |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | | 95 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Pro | Glu | Ala | Gly | Gly | Pro | Glu | Gly | Pro | Trp | Ala | Ser | Thr | Thr | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | 110 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ser | Gly | Gly | Pro | Glu | Ala | Thr | Ala | Ala | Ala | Gly | Asp | Gln | Gly | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 115 | | | | | | | | | | | | | | | 125 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|-----|
| Gly | Ala | Leu | Trp | Leu | Cys | Leu | Glu | Gly | Pro | Ala | His | Glu | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 130 | | | | | | | | | | | | | | | 140 |

10

<210> 38
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

20

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Gly | Glu | Ala | Glu | Thr | Arg | Glu | Cys | Ile | Tyr | Tyr | Asn | Ala | Asn |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Glu | Leu | Glu | Arg | Thr | Asn | Gln | Ser | Gly | Leu | Glu | Arg | Cys | Glu | Gly |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

ES 2 741 477 T3

20

25

30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
 100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
 115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu Thr Gly Gly
 130 135 140

Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 225 230 235 240

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 245 250 255

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 260 265 270

ES 2 741 477 T3

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
275 280 285

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
290 295 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
325 330 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
340 345 350

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
355 360 365

Gly Lys
370

<210> 39

<211> 512

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro

ES 2 741 477 T3

115

120

125

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Pro | Thr | Ala | Pro | Thr | Leu | Leu | Thr | Val | Leu | Ala | Tyr | Ser | Leu | Leu |
| 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | | |

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 741 477 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His

ES 2 741 477 T3

85

90

95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105 110

Ala Pro Thr
115

<210> 41

<211> 100

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

10 Leu Pro Glu Ala
100

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<221> variante

<222> (1)..(10)

<223> Esta secuencia puede abarcar de 2 a 10 residuos.

25 <400> 42

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 43

30 <211> 5

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<220>
<221> variante
<222> (1)..(5)

10 <223> Esta secuencia puede abarcar de 2 a 5 residuos.

<400> 43

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

15 <210> 44
<211> 4

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>
<221> variante
<222> (1)..(4)
<223> Esta secuencia puede abarcar de 2 a 4 residuos.

<400> 44

30 Gly Gly Gly Gly
1

<210> 45
<211> 4

35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 45

Thr Gly Gly Gly
1

45

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para su uso en el tratamiento o prevención de la sobrecarga de hierro en un paciente con talasemia, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, y en el que el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
2. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en el que el paciente tiene sobrecarga de hierro en el tejido.
3. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el paciente tiene niveles indeseablemente altos de eritropoyetina endógena.
4. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el paciente tiene β-talasemia intermedia o β-talasemia mayor.
5. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido aumenta los niveles de hepcidina en el paciente.
6. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido trata o impide la cardiomiopatía por sobrecarga de hierro.
7. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido reduce la hiperabsorción del hierro en la dieta.
8. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, en el que el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
9. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, en el que el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
10. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polipéptido comprende una D en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
11. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polipéptido comprende una E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
12. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.
13. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.
14. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.
- 50 15. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.
- 55 16. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el polipéptido es un homodímero.
17. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el polipéptido inhibe la señalización por miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células.
- 60 18. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el polipéptido puede administrarse en combinación con un agente quelante de hierro o múltiples agentes quelantes de hierro.

19. El polipéptido para su uso según la reivindicación 18, en el que los agentes quelantes de hierro son compuestos seleccionados de entre:

5 a. deforaxamina;

b. deferiprona; y

c. deferasirox.

10

ActRIIa ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNOSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT
GGPEVTYEPP PTAPT

Fig. 1

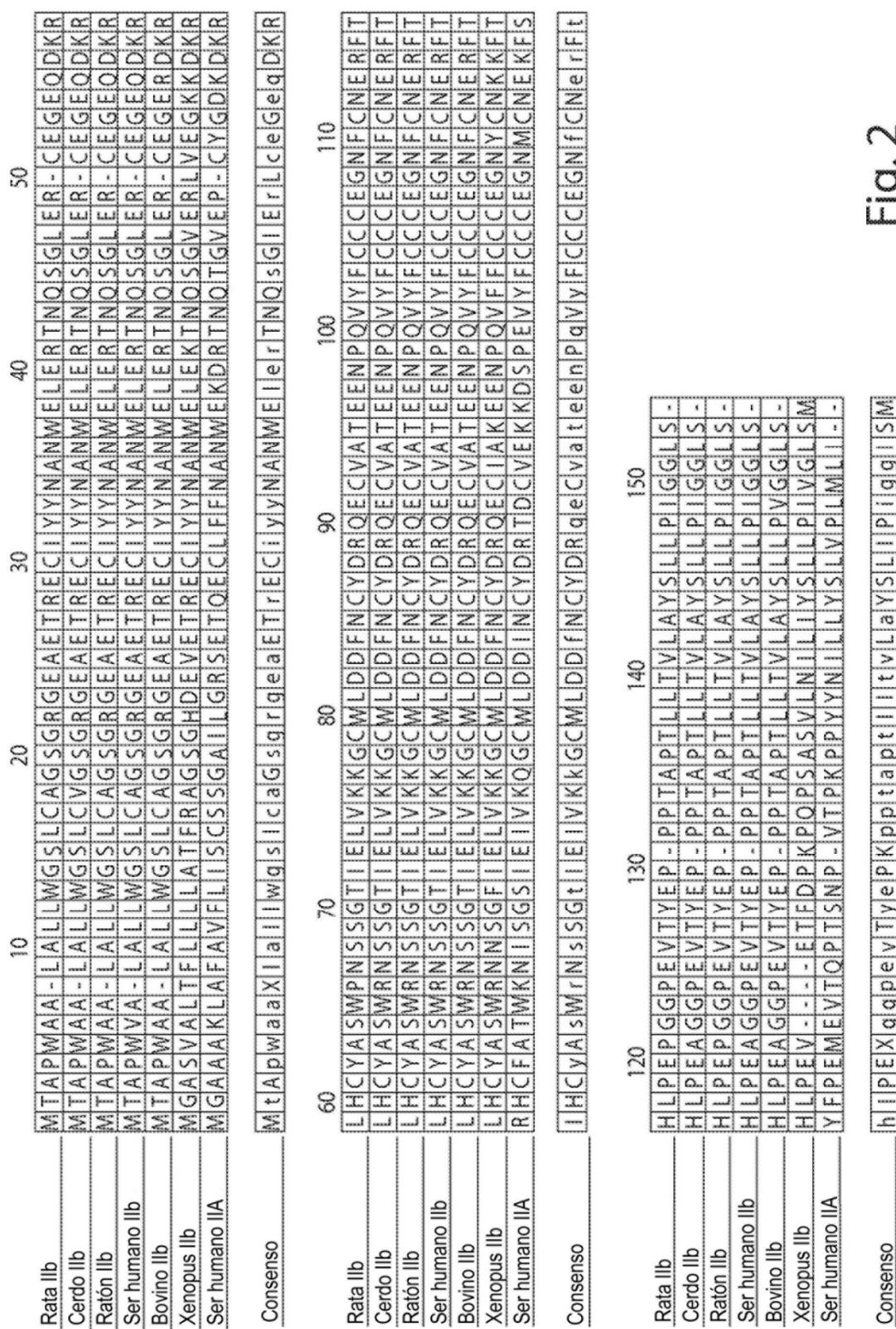


Fig. 2

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCGWDDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQOPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

Fig. 3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGCG TGAGGAGGCT GAGACACGGG
 TCAGAACCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG
 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTGCCCCACG TGACGATGCG
 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 GAGGACCCCG GATGTCGAGAC CCTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA
 251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT
 351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG
 401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCC
 GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 TGGGTTCCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT
 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 GTTGTGCGTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

Fig. 4

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCC
 CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

 751 GCCCCCACATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAAC
 CGGGGGTAGC TCTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCCGGA GGAGATGACC AAGAACCAAGG
 TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG
 AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCGGGG
 CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCC

 1101 TAAATGA (SEQ ID NO:25)
 ATTACT (SEQ ID NO:33)

Fig. 4 (cont.)

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)

Fig. 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
TCAGAACAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

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

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCCGAGGA CCCCGTTGTC

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

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

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

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

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC TCTGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCCTGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCAACCA CCTGCACCTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Fig. 6

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951 CTTCCCTCAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCC

 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO: 34)

Fig. 6 (cont.)

1 **E**TRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCW**D**DDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151 VVDVSCHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTAKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P PSREEMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPPVLDSDG SFFLYSKLT
301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 28)

Fig. 7

1 **E**TRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCW**D**DDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 29)

Fig. 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACCGACG ACACACCTCG
 E T R E C I Y Y
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CCGCCGA~~AAC~~ CCCCGA~~A~~TGT AT~~T~~TATTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT
 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 101 ATGCTAA~~T~~TG GGA~~A~~CTCGAA CGGACCAACC AATCCGGCT CGAACCGTGT
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCGA GCTTGCCACA
 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 151 GAGGGGGAAC AGGA~~T~~AAACG CCTCCAT~~T~~GC TATGCGTCGT GGAGGAAC~~T~~C
 CTCCCCCTTG TCCTATTG TGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG
 S G T I E L V K K G C W D D D F
 201 CTCCGGGACG AT~~T~~GAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GA~~C~~GAT~~T~~CA
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTCC CACGACCCCTG CTGCTAAAGT
 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CGGAAGAGAA TCCGGCAGGTC
 TAACAATACT GGCGGTCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG
 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 301 TATTTCTGTT GTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAAACGGT TTACCCACCT
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA
 P E A G G P E V T Y E P P P T
 351 CCCCGAAGGC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CGAACCGGTG
 GGGGCTTCGG CCGCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGCGGCCAC
 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC TCTGGGGGA
 401 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT
 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGAGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 451 GGCCTGGGA CTCCAGTGTG CGCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 501 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Fig. 9

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 751 AAAGCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGTAG

 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GCCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901 GAGAACAACT ACAAGACAC GCCTCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO: 35)

Fig. 9 (cont.)

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA
CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG
CCTCCATTGC TATGCCGTCGT GGAGGAACTC CTCCGGGACCG ATTGAACTGG
TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA ATTGTTATGA CCCGCCAGGAA
TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT GTTGCAGGG
GAATTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG
AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACC (SEQ ID NO: 31)

Fig. 10

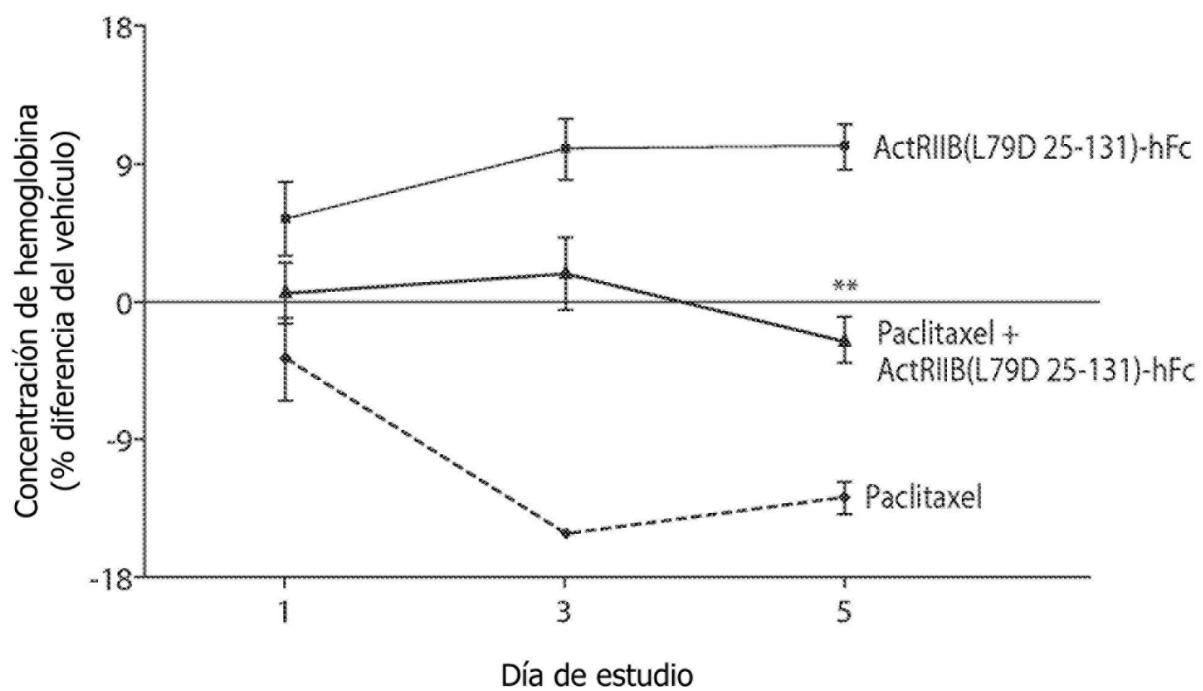


Fig. 11

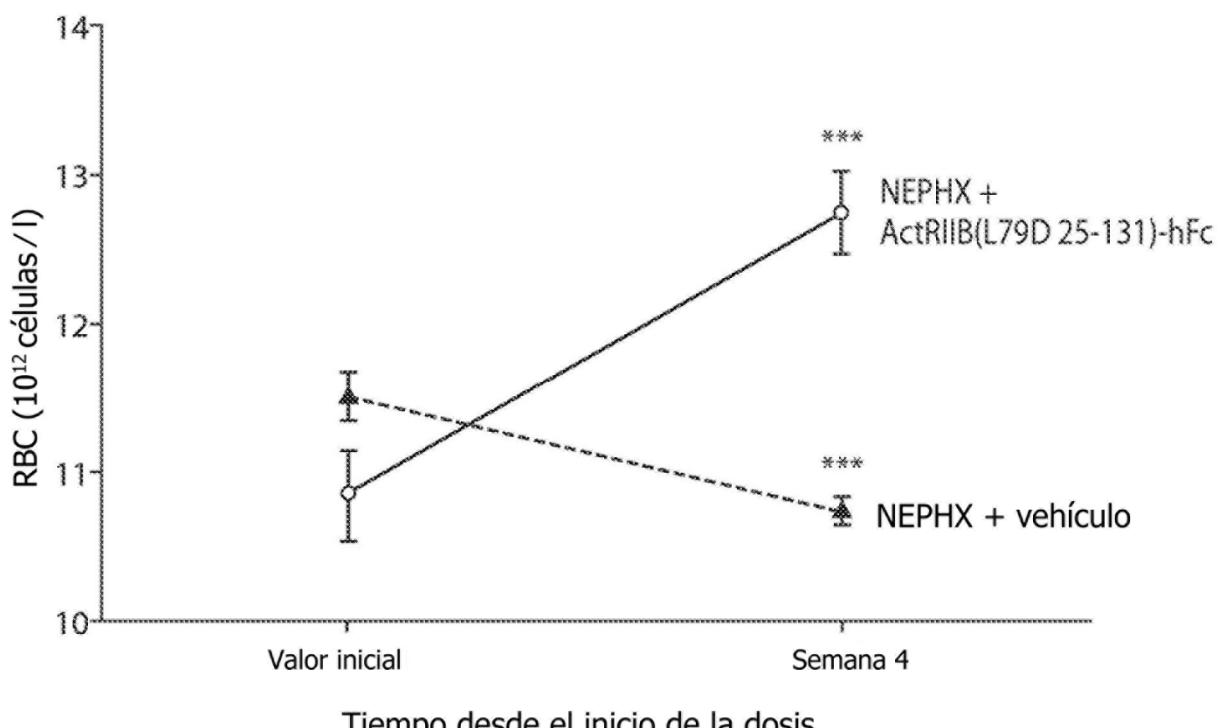


Fig. 12

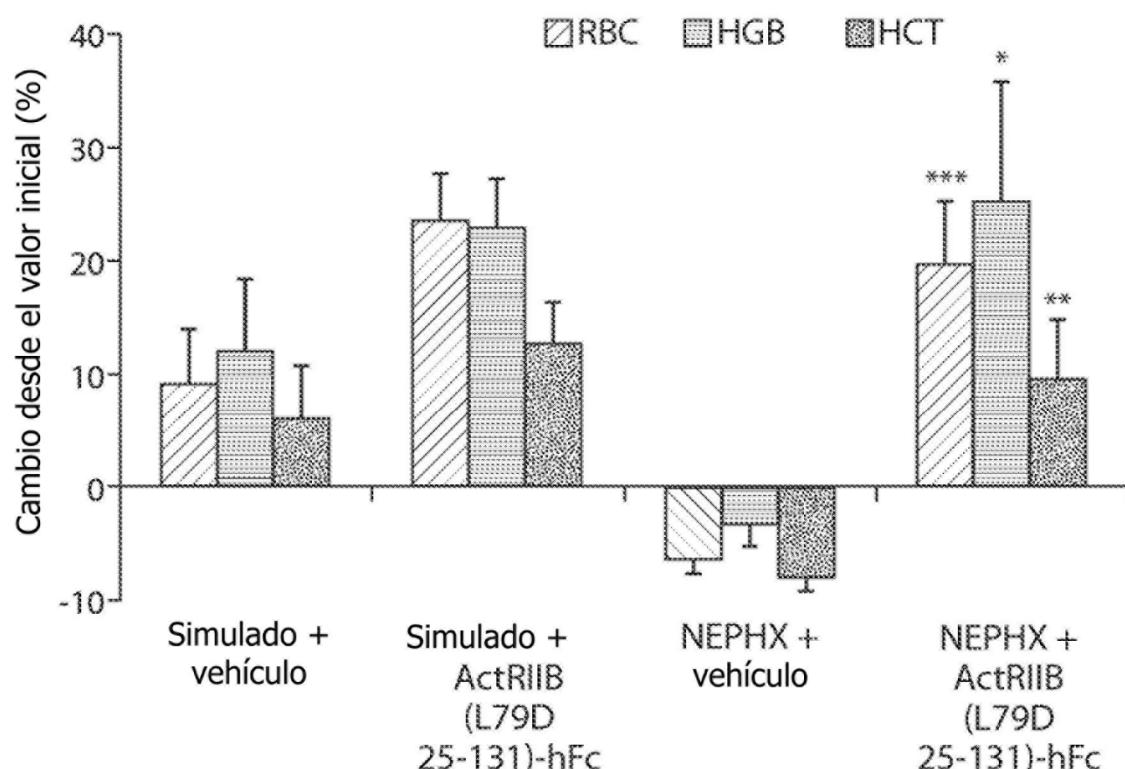


Fig. 13

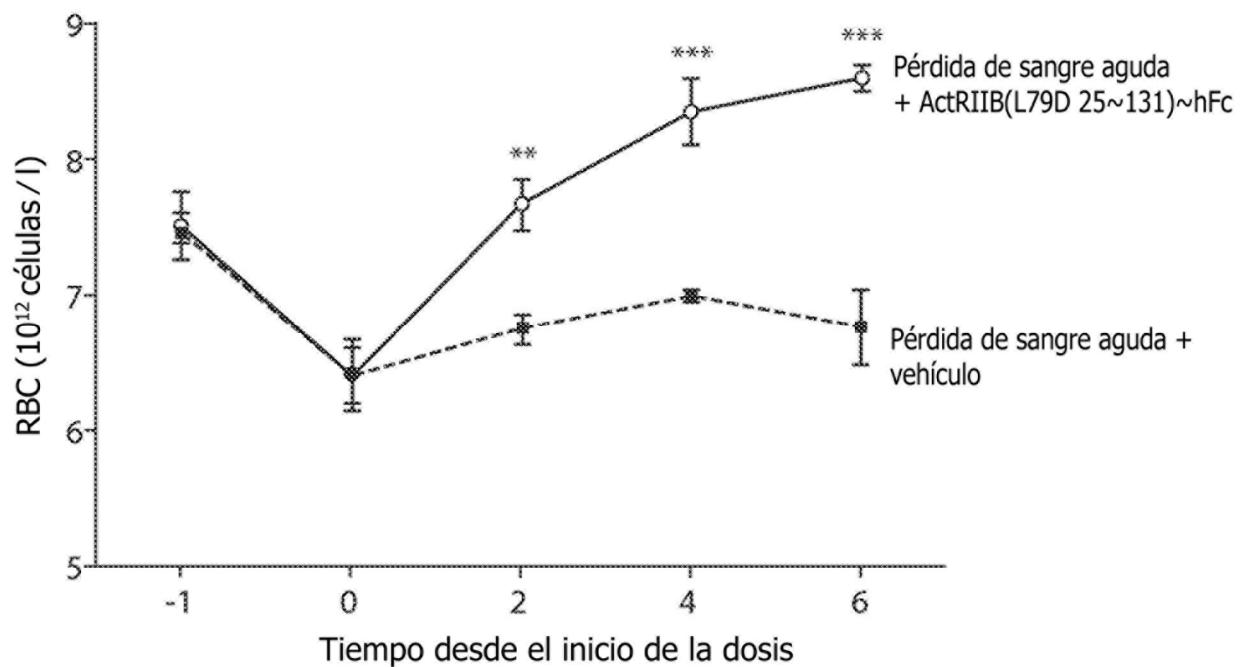


Fig. 14

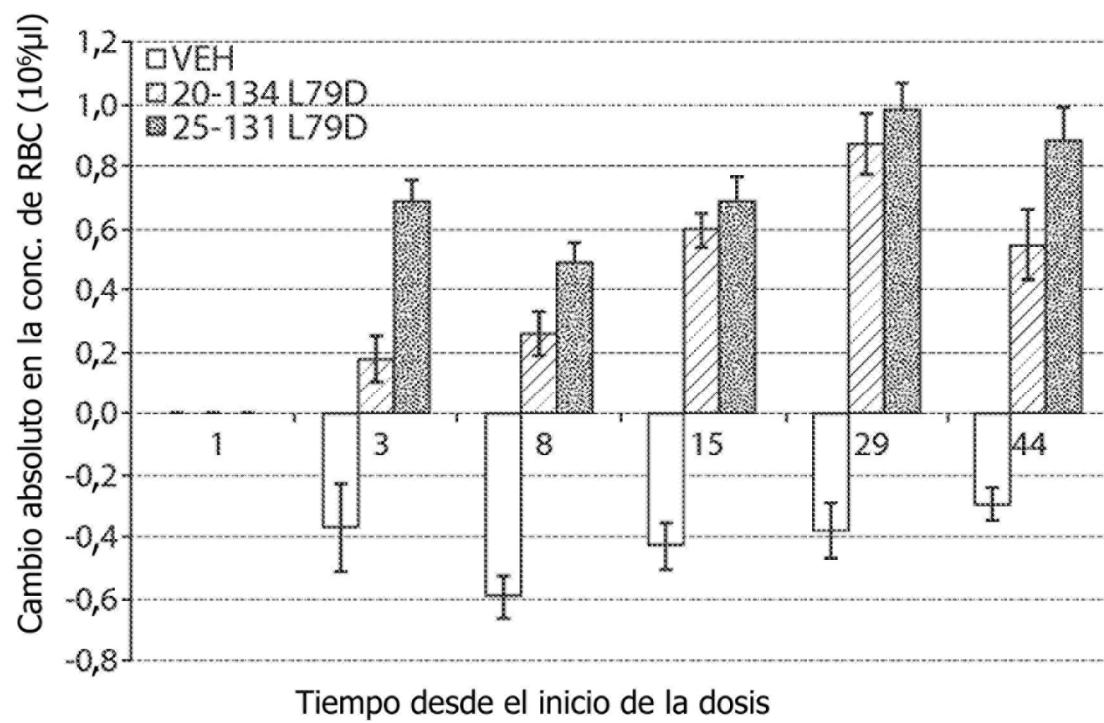


Fig. 15

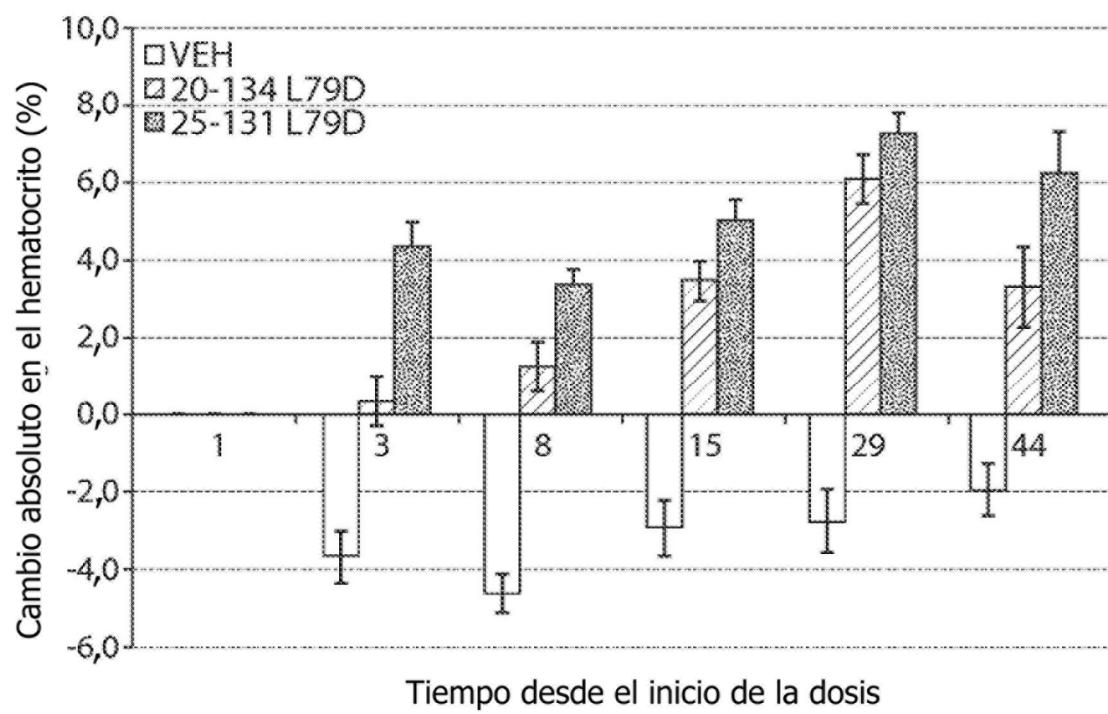


Fig. 16

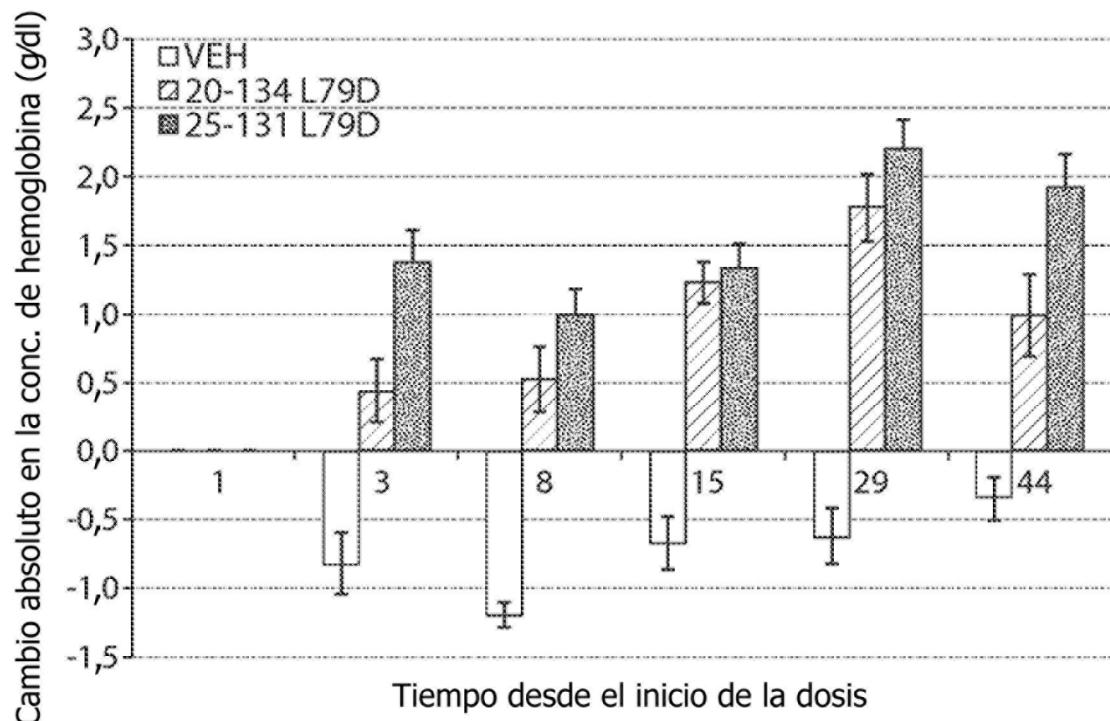


Fig. 17

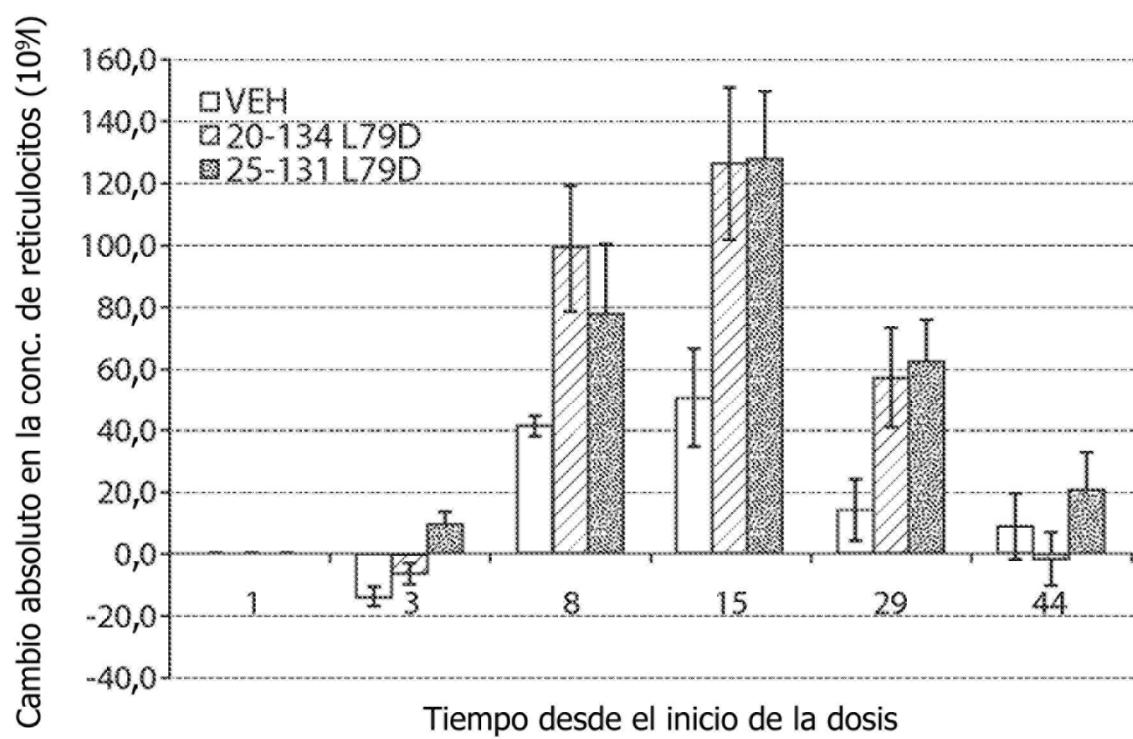


Fig. 18

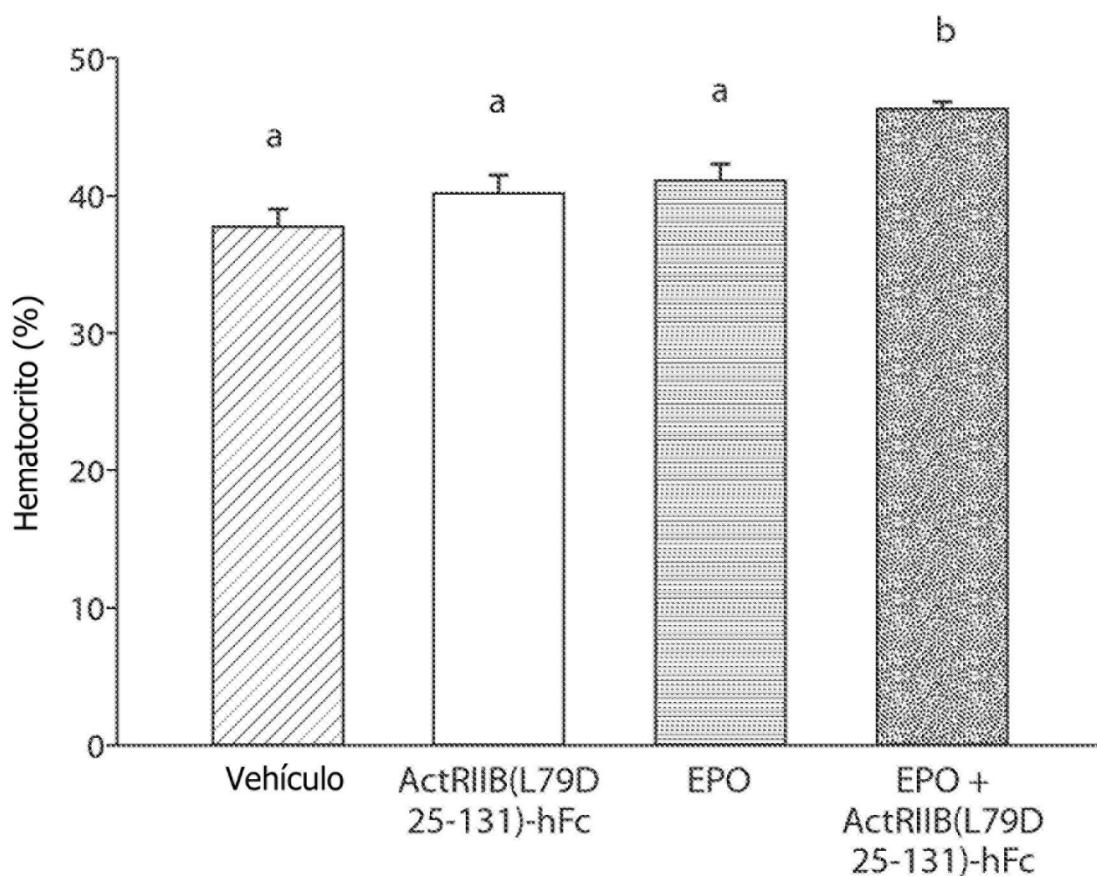


Fig. 19

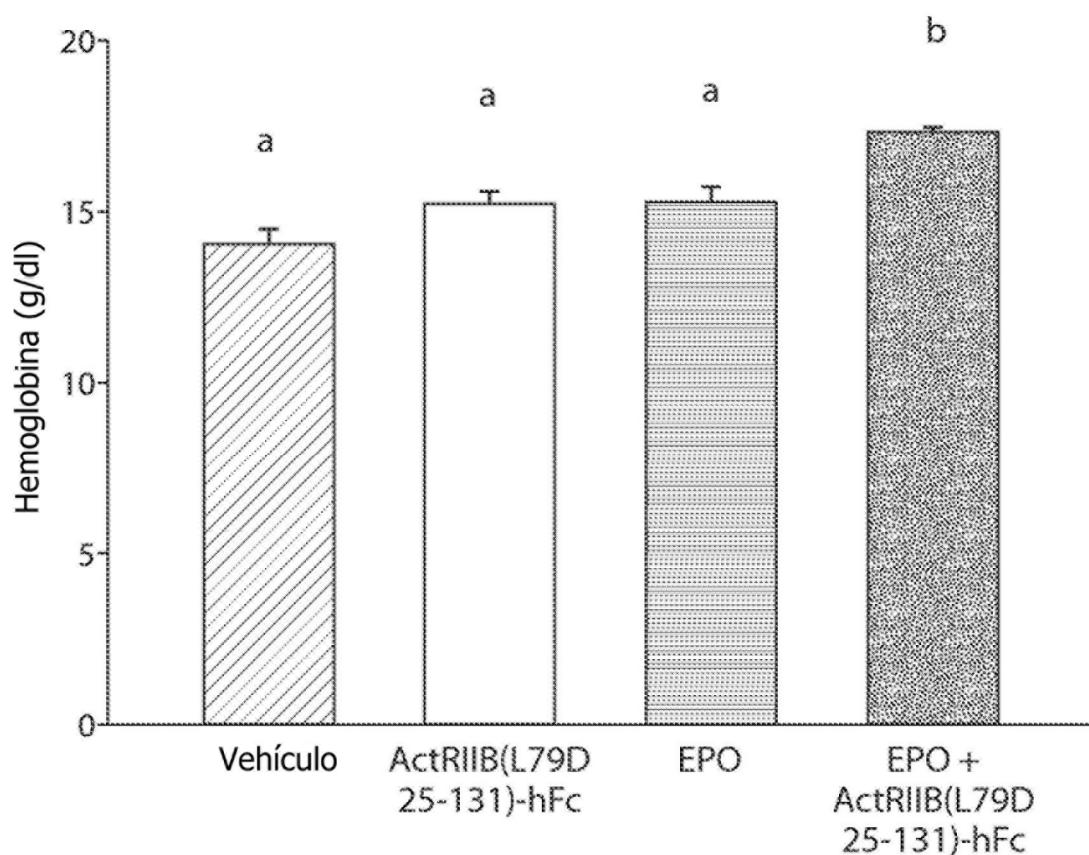


Fig. 20

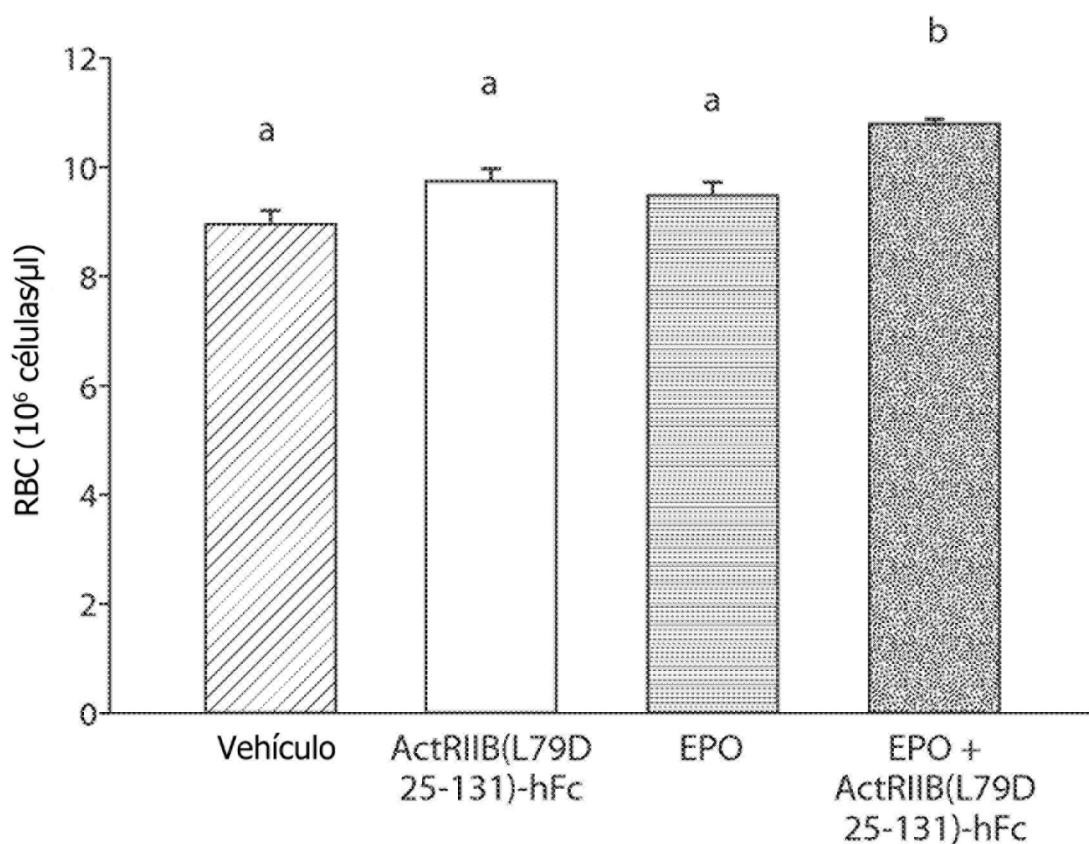


Fig. 21

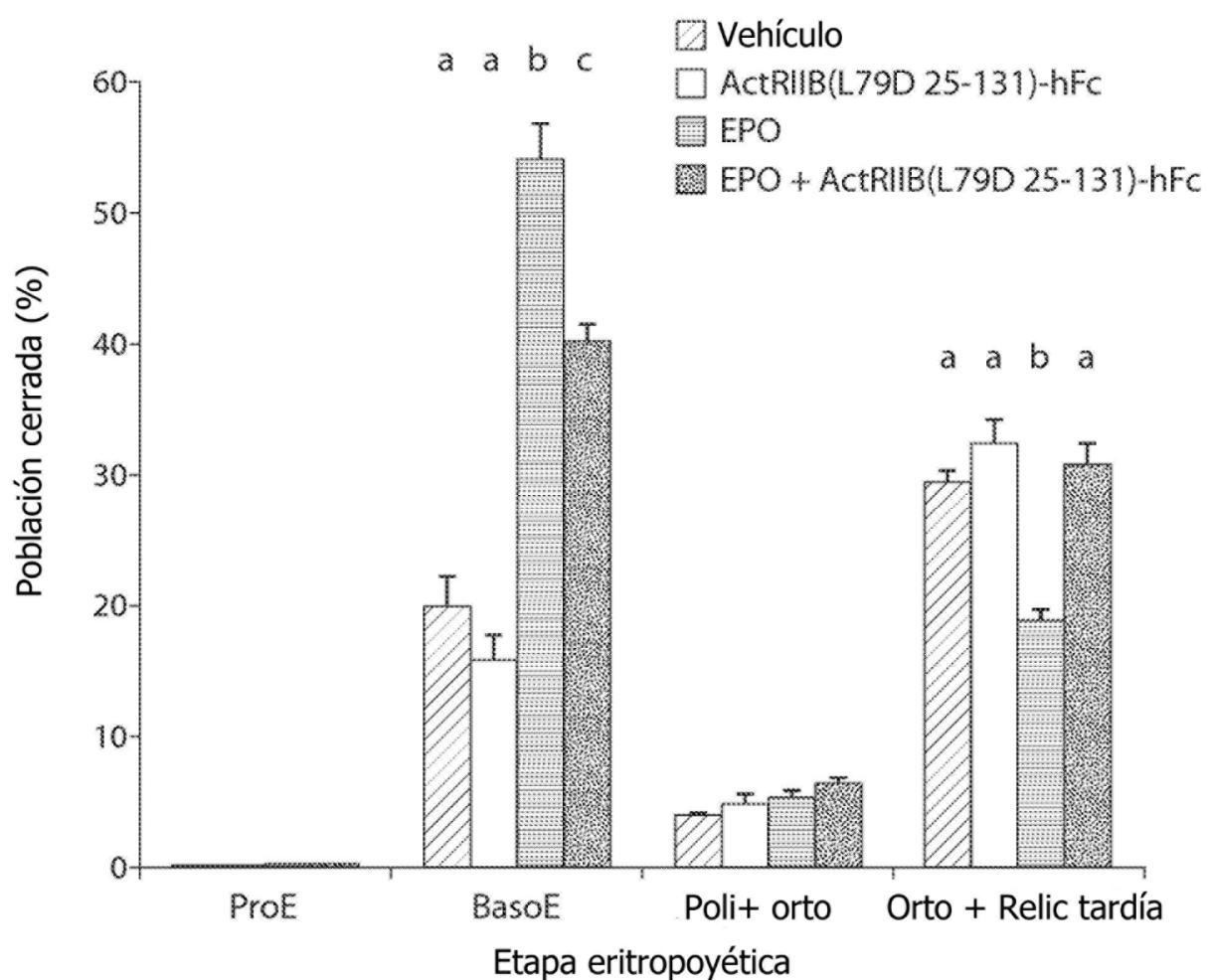


Fig. 22

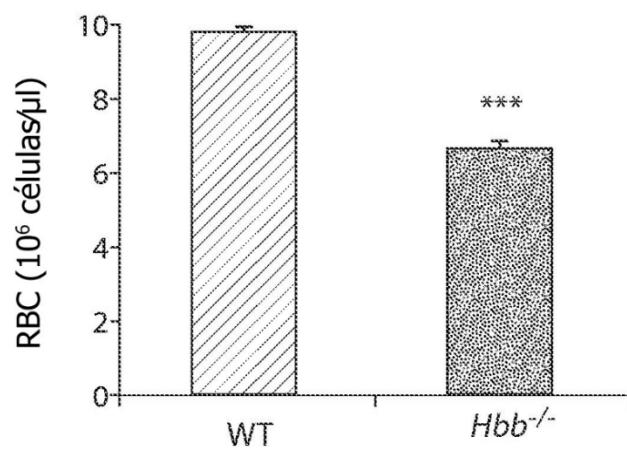


Fig. 23A

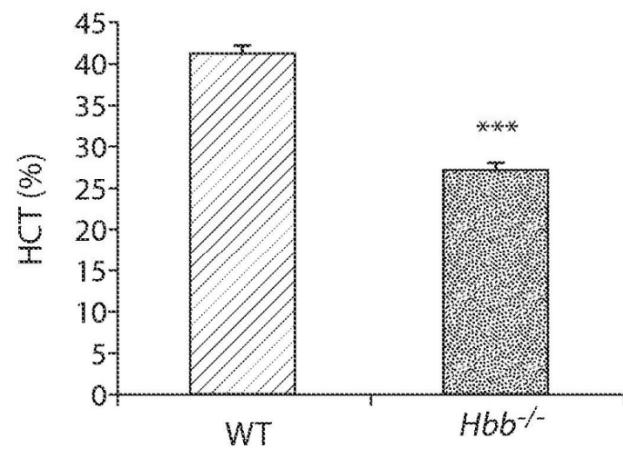


Fig. 23B

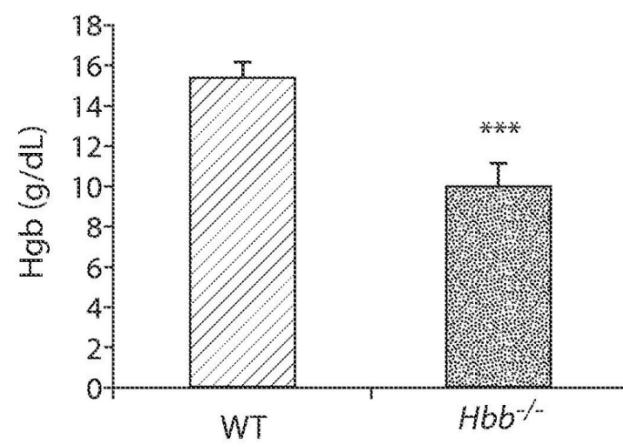


Fig. 23C

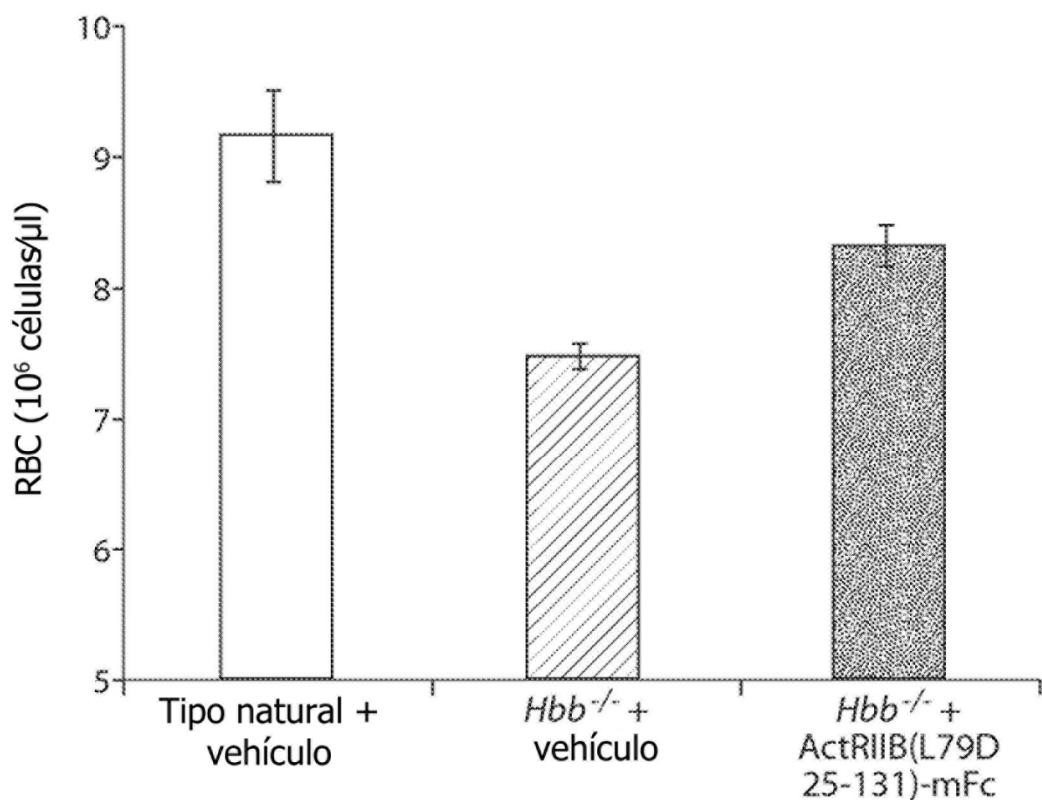


Fig. 24

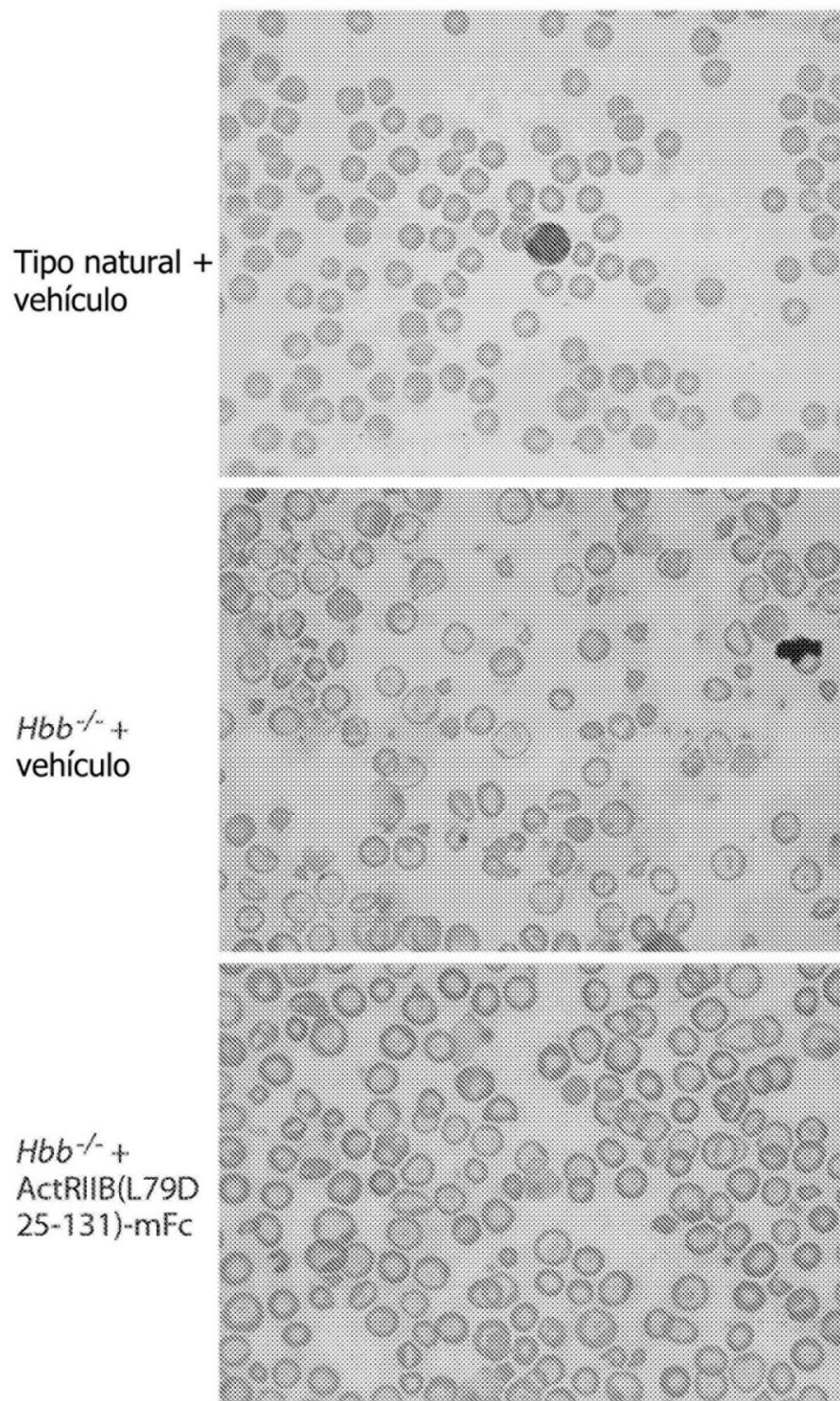


Fig. 25

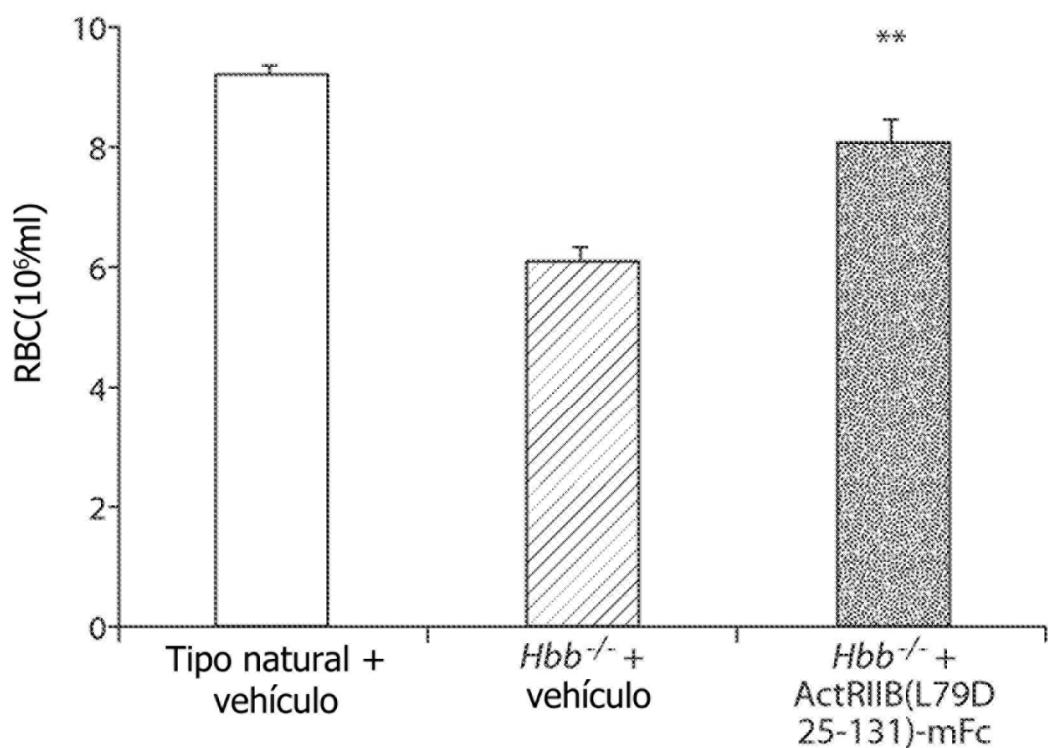


Fig. 26

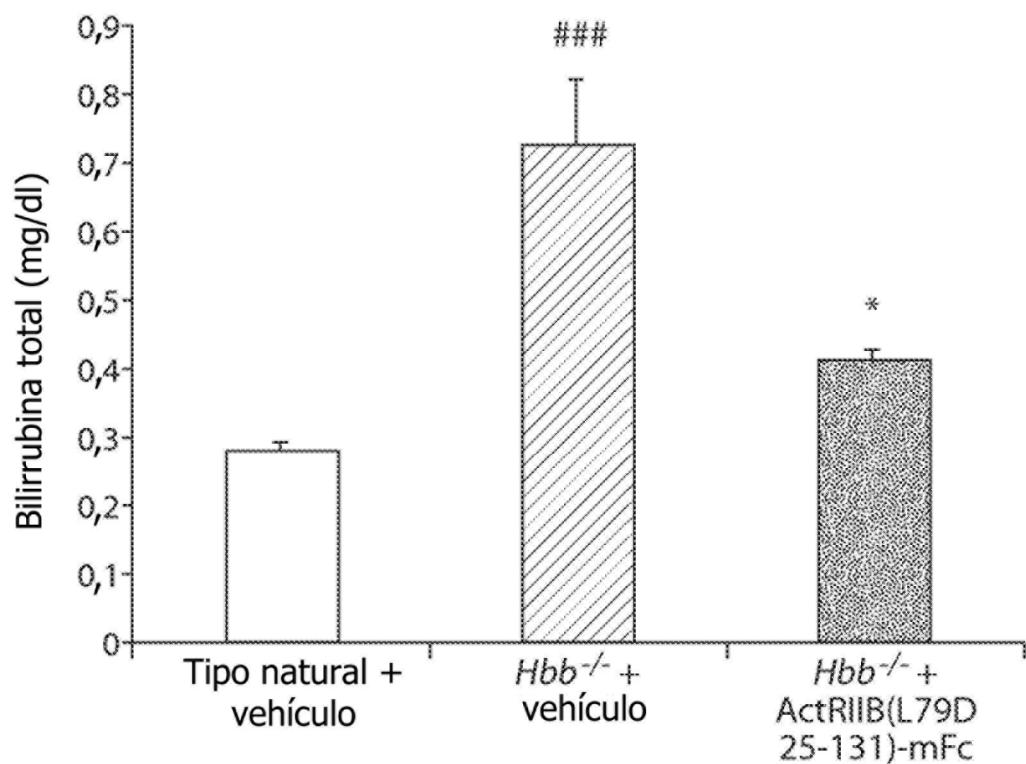


Fig. 27

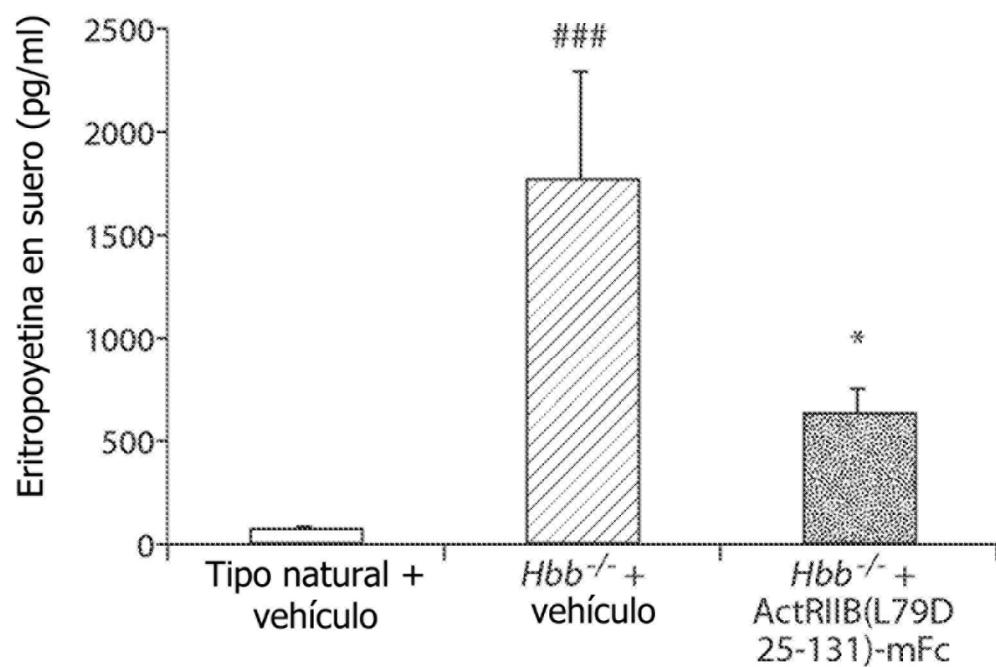


Fig. 28

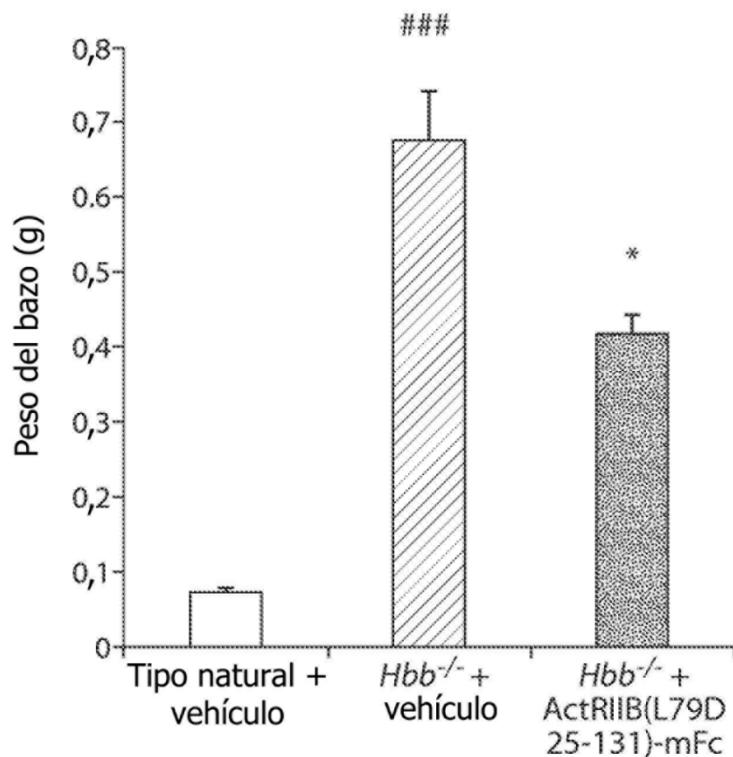


Fig. 29A

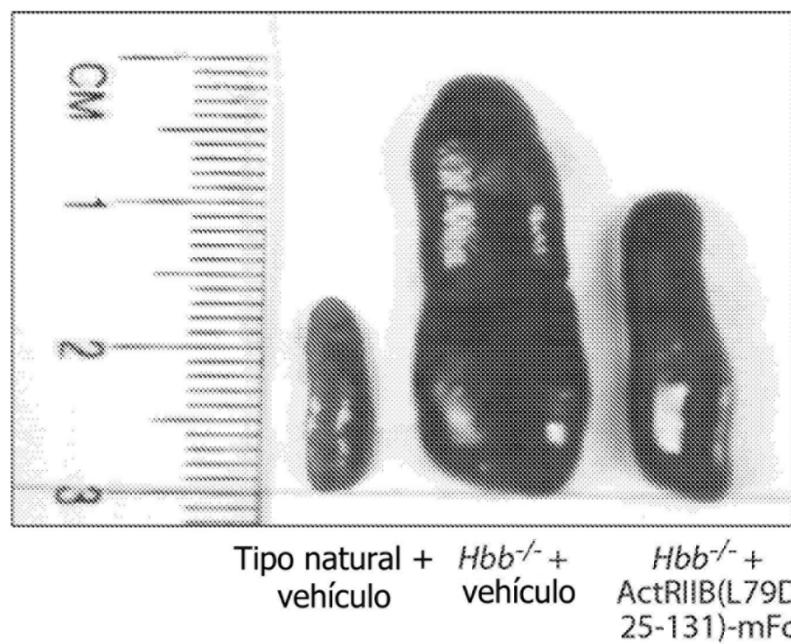


Fig. 29B

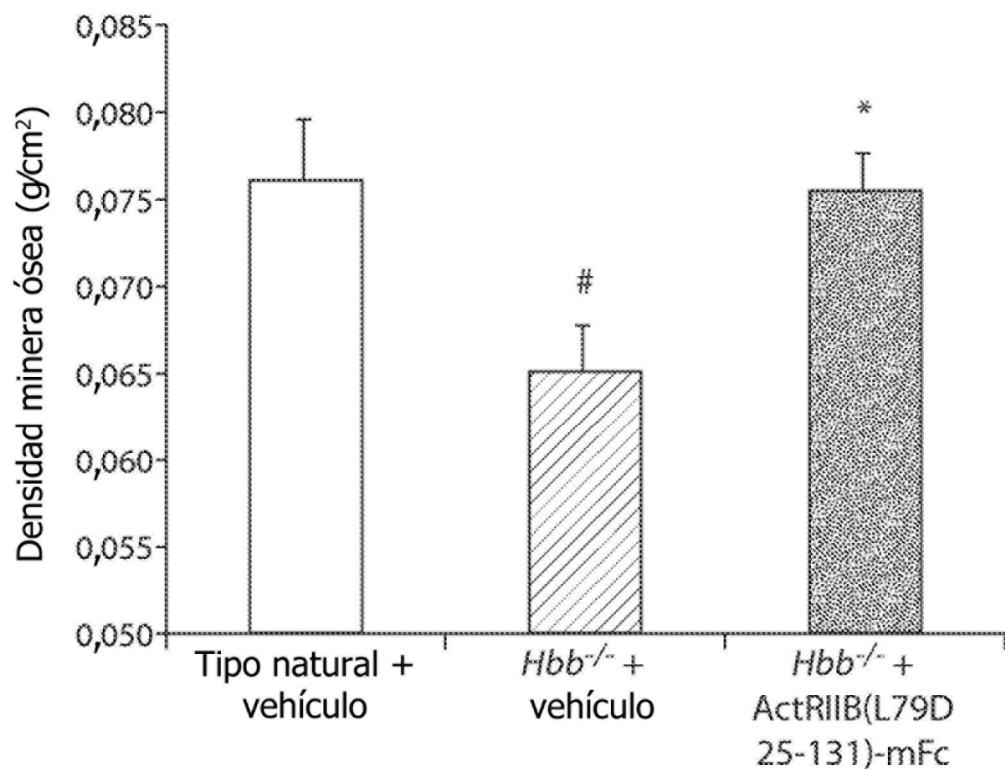


Fig. 30

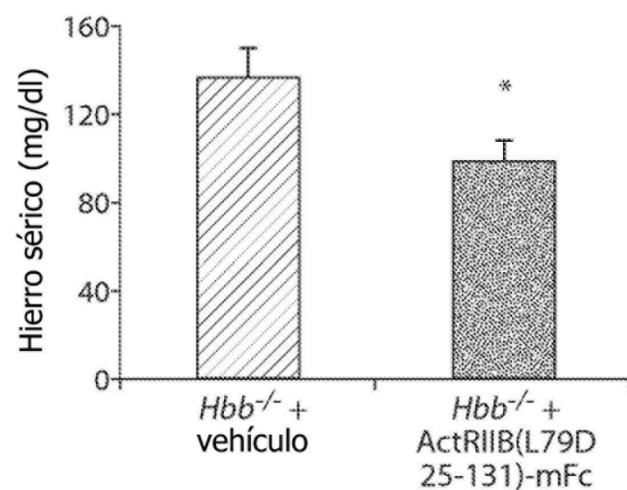


Fig. 31A

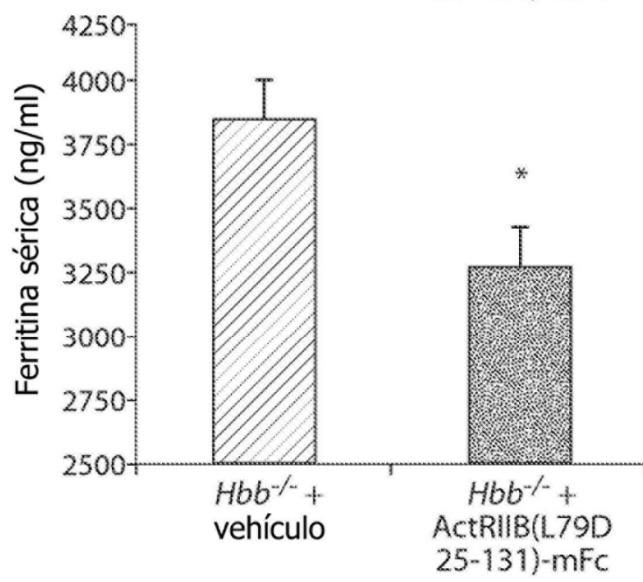


Fig. 31B

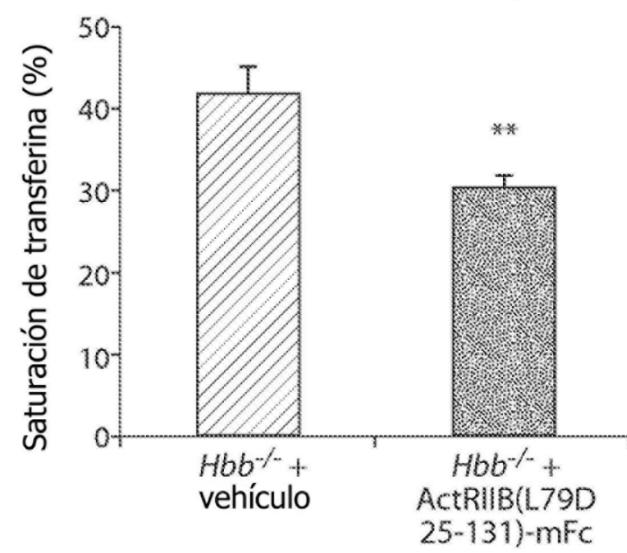


Fig. 31C

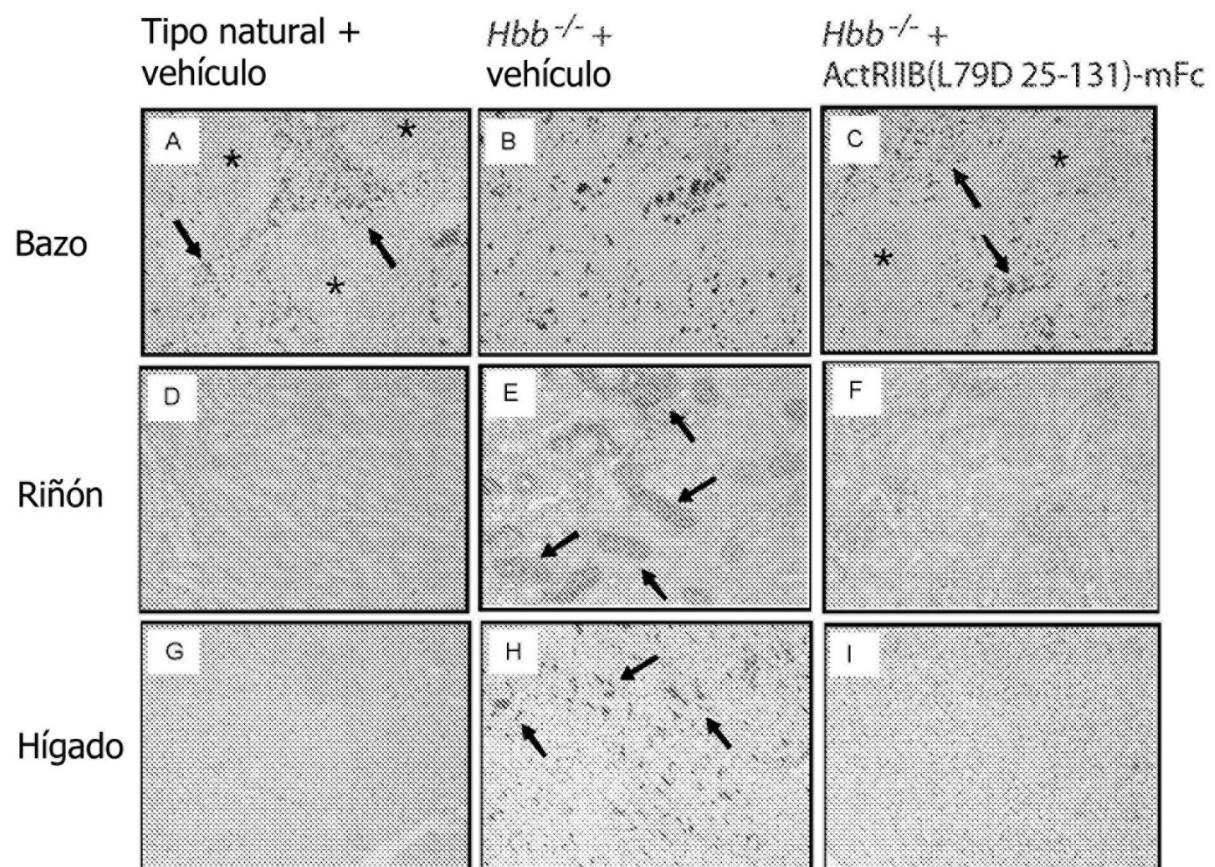


Fig. 32

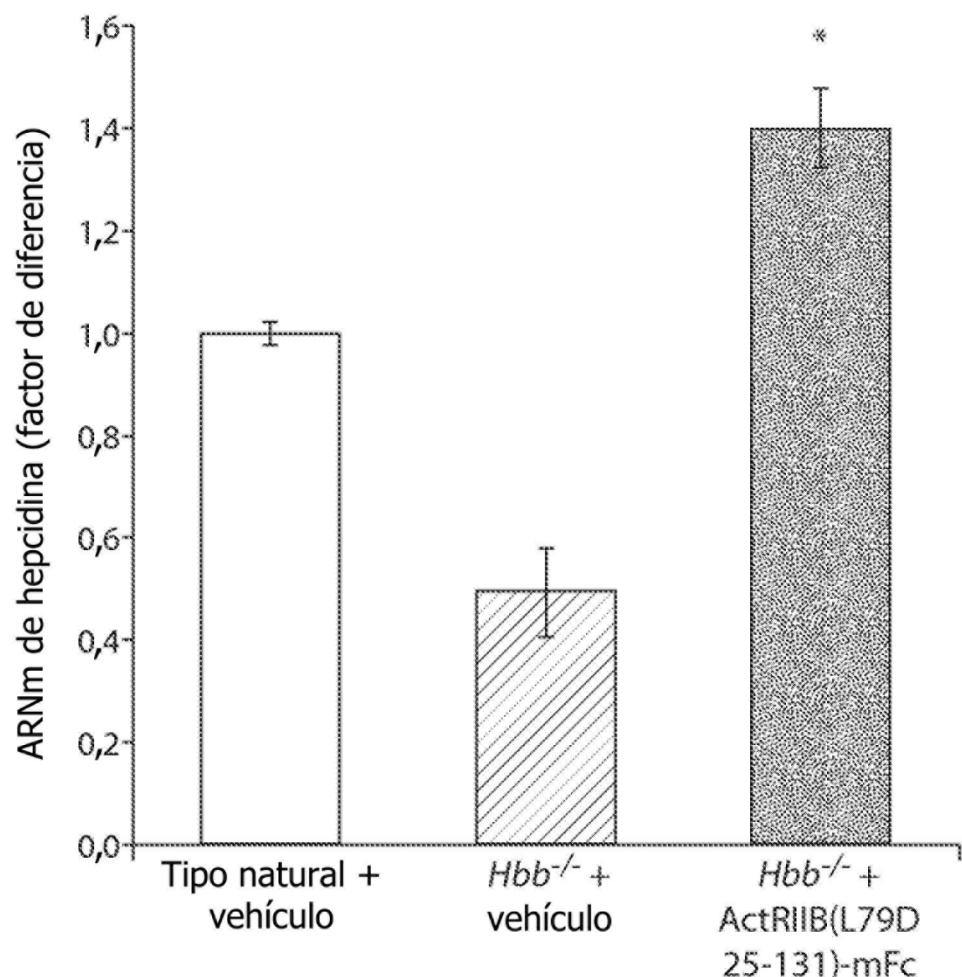


Fig. 33

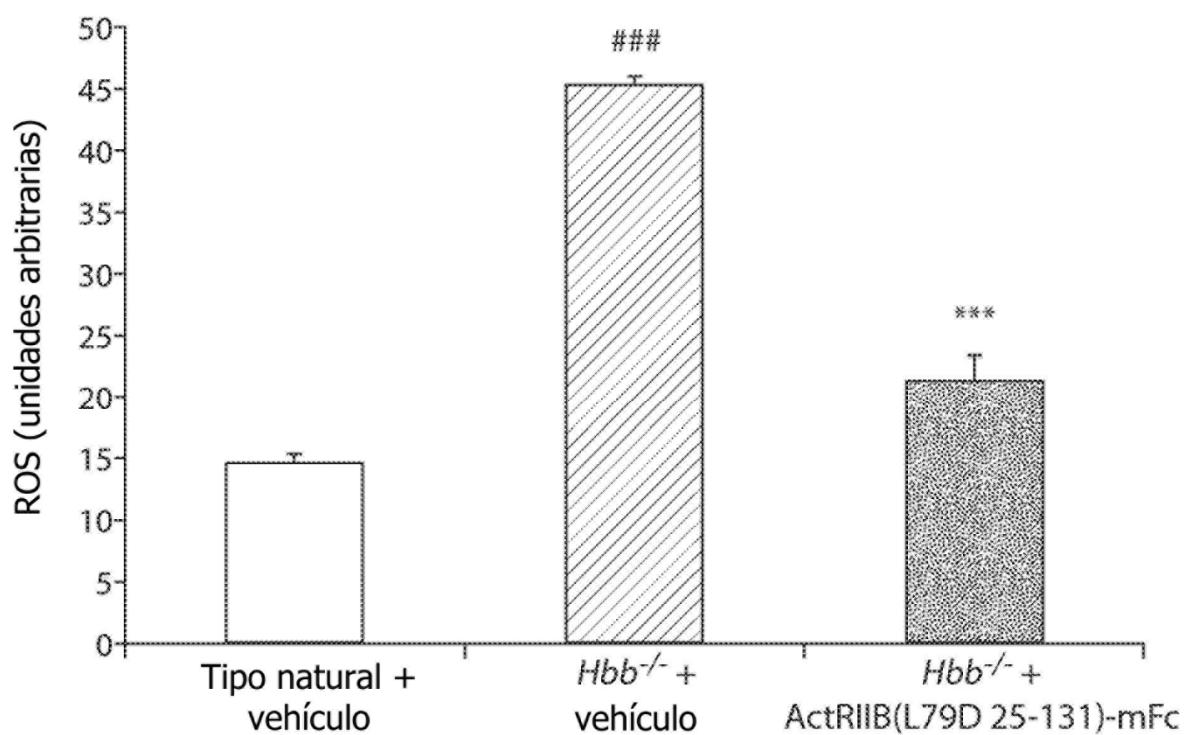


Fig. 34