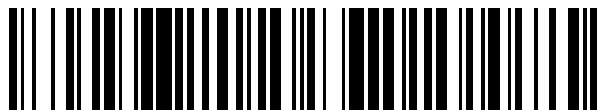


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 852 699**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2009 PCT/US2009/003808**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09158015**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09770553 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 2303917**

(54) Título: **Antagonistas de ActRIIb y usos para aumentar los niveles de glóbulos rojos**

(30) Prioridad:

26.06.2008 US 133368 P

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

14.09.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**SHERMAN, MATTHEW, L.;
SEEHRA, JASBIR y
BORGSTEIN, NIELS**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 852 699 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

Antagonistas de ActRIIb y usos para aumentar los niveles de glóbulos rojos

5 Antecedentes de la invención

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

Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un proceso denominado eritropoyesis. En los individuos posnatales, la eritropoyesis ocurre principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de varias vías de señalización controla el equilibrio de la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular. En condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a un ritmo que mantiene una masa de glóbulos rojos constante en el cuerpo, y la producción puede aumentar o disminuir en respuesta a diversos estímulos, incluido el aumento o disminución de la tensión de oxígeno o la demanda tisular. El proceso de eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras comprometidas con el linaje y avanza a través de una serie de tipos distintos de células precursoras. Las etapas finales de la eritropoyesis ocurren cuando los reticulocitos se liberan en el torrente sanguíneo y pierden sus mitocondrias y ribosomas mientras asumen la morfología de glóbulos rojos maduros. Un nivel elevado de reticulocitos, o una relación reticulocitos: eritrocitos elevada en la sangre, indica un aumento de las tasas de producción de glóbulos rojos.

25 **La eritropoyetina (Epo) se reconoce ampliamente como el regulador positivo más significativo de la eritropoyesis en vertebrados posnatales. La Epo regula la respuesta eritropoyética compensatoria para reducir la tensión de oxígeno tisular (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 aumenta la eritropoyesis principalmente en el bazo.**

30 **Los médicos utilizan diversas formas de Epo recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en una variedad 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 provocada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de glóbulos rojos. Más comúnmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall y Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia puede ser el resultado de una tasa reducida de producción o una mayor tasa de destrucción de glóbulos rojos o por la pérdida de glóbulos rojos debido a hemorragias. La anemia puede resultar de una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.**

40 **45 **El tratamiento con Epo generalmente provoca un aumento de las hemoglobinas en aproximadamente 1-3 g/dL en seres humanos sanos durante un período de semanas. Cuando se administra a personas anémicas, 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 eficaz y muchos individuos son refractarios incluso a dosis altas (Horl y otros (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Más del 50 % de los pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la Epo, aproximadamente el 10 % con enfermedad renal en etapa terminal presentan hiporespuesta (Glaspy y otros (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri y otros (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), y menos del 10 % con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Varios factores, que incluyen inflamación, deficiencia de hierro y vitaminas, diálisis inadecuada, toxicidad por aluminio e hiperparatiroidismo pueden predecir una respuesta terapéutica deficiente; los mecanismos moleculares de resistencia a la Epo aún no están claros.****

50 **55 Por tanto, es un objeto de la presente divulgación proporcionar composiciones y procedimientos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en los pacientes.**

Sumario de la invención

El ámbito para el que se solicita protección es el definido en las reivindicaciones.

60 **65 En parte, la divulgación proporciona antagonistas de ActRIIb que se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. En particular, la divulgación demuestra que una forma soluble de ActRIIb, que actúa como inhibidor de activina o miostatina u otros ligandos de ActRIIb, estimula las actividades de eritropoyesis (por ejemplo, aumenta los reticulocitos, aumenta los progenitores eritroides maduros e inmaduros, etc.) cuando se administra *in vivo*. Si bien el ActRIIb soluble puede afectar los niveles de glóbulos rojos a través de un mecanismo diferente al antagonismo de activina o miostatina, la divulgación demuestra, no obstante, que los agentes terapéuticos deseables se pueden seleccionar sobre la base del antagonismo de activina, antagonista de miostatina**

o antagonismo de ActRIIb o cualquiera de los anteriores. Como se describe en la Publicación de EE. UU. No. 2009/0005308, los antagonistas de ActRIIb se pueden utilizar para promover el crecimiento muscular y aumentar la fuerza muscular. En consecuencia, la divulgación proporciona procedimientos para promover el crecimiento muscular y aumentar los niveles de glóbulos rojos, particularmente en pacientes con trastornos que se caracterizan por anemia y pérdida de músculo, como cáncer y pérdida de músculo relacionada con el tratamiento del cáncer, muchas formas de caquexia y sarcopenia (pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento). Los antagonistas de ActRIIb también se pueden usar para promover el crecimiento óseo y aumentar los glóbulos rojos en pacientes que lo necesitan, como pacientes con osteoporosis y anemia, o pacientes con cánceres (o receptores de tratamientos de quimioterapia) asociados con pérdida ósea y anemia.

10 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden un polipéptido de ActRIIb de unión a ligando soluble que se une a activina o miostatina u otro ligando de ActRIIb. Los polipéptidos de ActRIIb se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido de ActRIIb de unión a ligando (por ejemplo, unión de activina) y un portador farmacéuticamente aceptable. El polipéptido de ActRIIb de unión a ligando

15 se puede unir a activina con una K_D menor de 1 micromolar o menor de 100, 10 o 1 nanomolar. La composición puede tener al menos un 95 % de pureza, con respecto a otros componentes polipeptídicos, según se evalúa mediante cromatografía de exclusión por tamaño y, opcionalmente, la composición es al menos un 98 % pura. Un polipéptido de ActRIIb para su uso en tal preparación puede ser cualquiera de los divulgados en la presente memoria, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 6,

20 8 o 9 o que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 6, 8, o 9. Un polipéptido de ActRIIb activo puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIb natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-3 o una secuencia que carece de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola") tal como SEQ ID NO: 3.

25 Un polipéptido de ActRIIb soluble de unión a ligando (por ejemplo, de unión a activina) puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) con respecto a un polipéptido de ActRIIb de origen natural. Ejemplos de polipéptidos de ActRIIb alterados se proporcionan en WO 2006/012627, pp. 59-60 y pp. 55-58, respectivamente, y a lo largo de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/012,652. 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 eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con respecto al polipéptido de ActRIIb de origen natural.

30 Un polipéptido de ActRIIb de unión a ligando (por ejemplo, de unión a activina) puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido de ActRIIb (por ejemplo, una porción de unión de ligando de un ActRIIb) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, orientación a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar una o más de la estabilidad in vivo, la vida media in vivo, la captación/administración, la localización o distribución tisular, la formación de complejos proteicos, la multimerización de la proteína de fusión y/o la purificación. Una proteína de fusión de ActRIIb de unión a ligando puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina

35 (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina de suero u otra porción de polipéptido que proporciona propiedades deseables tales como farmacocinética mejorada, solubilidad mejorada o estabilidad mejorada. En una realización preferente, una fusión ActRIIb-Fc comprende un enlazador relativamente no estructurado que se posiciona entre el dominio Fc y el dominio ActRIIb extracelular. Este enlazador no estructurado puede ser una secuencia artificial de 1,

40 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o una longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria, o una mezcla de ambos. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una única secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, TG₄ (SEQ ID NO: 14) o SG₄ (SEQ ID NO: 15) singletes o repeticiones). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una secuencia de epítopo, una secuencia FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST. Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIb soluble

45 incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se

50 usa para tratar un trastorno óseo, un trastorno muscular o un compuesto que se usa para tratar la anemia. Preferentemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferente que una proteína ActRIIb se exprese en una línea celular de mamífero que medie adecuadamente la glicosilación natural de la proteína ActRIIb para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente. Se han usado con éxito líneas celulares humanas y CHO, y se espera que sean útiles otros sistemas de expresión

55 de mamíferos comunes.

60 En algunas realizaciones, las proteínas ActRIIb denominadas ActRIIb-Fc tienen propiedades específicas, que incluye la unión selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11 o viceversa, unión de ligando de alta afinidad y semivida sérica superior a dos semanas en modelos animales y en pacientes humanos. En determinadas realizaciones, la invención proporciona polipéptidos de ActRIIb-Fc y preparaciones farmacéuticas que comprenden dichos polipéptidos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

65

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de ActRIIb de unión a ligando soluble. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia que codifica para un polipéptido de ActRIIb soluble que se une al ligando (por ejemplo, de unión a activina), tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un dominio extracelular (por ejemplo,

- 5** dominio de unión a ligando) de un ActRIIb y una secuencia que codificaría parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplásmico de un ActRIIb, pero para un codón de parada ubicado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o ubicado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia de polinucleótidos de ActRIIb de longitud completa tal como la SEQ ID NO: 4 o una versión truncada parcialmente de ActRIIb tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 5 que corresponde al dominio extracelular de ActRIIb. Un polinucleótido aislado puede comprender además un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o posicionado de otra forma de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIb de longitud completa. Una secuencia de ácido nucleico preferente para ActRIIb es SEQ ID NO: 10. Los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria se pueden unir operativamente a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

- 20** En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para preparar un polipéptido de ActRIIb de unión a ligando (por ejemplo, unión a activina) soluble. Tal procedimiento puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5 o 10) divulgados en la presente memoria en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. Tal procedimiento puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de ActRIIb soluble, en el que dicha célula se transforma con una construcción de expresión de ActRIIb soluble; y b) recuperar el polipéptido de ActRIIb soluble así expresado. Los polipéptidos de ActRIIb solubles se pueden recuperar como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación se puede lograr mediante una serie de pasos de purificación, que incluyen, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, sefarosa Q), cromatografía de interacción hidrofóbica (por ejemplo, fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. Los polipéptidos de ActRIIb solubles se pueden formular en formas líquidas o sólidas (por ejemplo, liofilizadas).

- 35** En ciertos aspectos, un antagonista de ActRIIb divulgado en la presente memoria se puede usar en un procedimiento para promover la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. La divulgación proporciona procedimientos para tratar un trastorno asociado con recuentos bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina (por ejemplo, una anemia), o para promover la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesiten. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de antagonista de ActRIIb. La divulgación proporciona procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y promover el crecimiento muscular o aumentar la fuerza muscular en un paciente que lo necesite. La divulgación demuestra que, en roedores, los antagonistas de ActRIIb aumentan los niveles de células precursoras eritroides principalmente a través de efectos sobre el bazo. Por consiguiente, la divulgación proporciona procedimientos para aumentar la liberación de glóbulos rojos del bazo, el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIb. En ciertos aspectos, la divulgación proporciona usos de antagonistas de ActRIIb para fabricar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en la presente memoria.

- 45** En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento para identificar un agente que estimula la producción de glóbulos rojos. El procedimiento comprende: a) identificar un agente de prueba que se une a activina o un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActRIIb; y b) evaluar el efecto del agente sobre los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o niveles de precursores de glóbulos rojos (por ejemplo, niveles de reticulocitos).

50 Breve descripción de los dibujos

- 55** La Figura 1 muestra una alineación de ActRIIA y ActRIIB humanos con los residuos que se deducen en la presente memoria, en base al análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para contactar directamente el ligando (el bolsillo de unión del ligando) indicado con recuadros.

Descripción detallada de la invención

1. Información general

- 60** La superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiógenésis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células

epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Al manipular la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piamontesa y belga azul portan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que provoca un marcado aumento en la masa muscular. Grobet y otros, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 se asocian con un aumento de la masa muscular y, según se informa, con una fuerza excepcional. Schuelke y otros, N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

- 5 Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia TGF-beta. 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 también se conocen formas heterodiméricas que contienen β_C o β_E . En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir positiva o negativamente en el progreso del ciclo celular en función del tipo de célula e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios De Paolo y otros, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198: 500-512; Dyson y otros, 1997, Curr Biol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963). Además, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata y otros, 1988, PNAS, 85: 2434.). Se ha sugerido que la activina A promueve la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina previene la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP) y α_2 -macroglobulina.
- 10 25 30 35 40
- Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina quinasa tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad corriente abajo tras la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores de tipo II son necesarios para unir ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión del ligando, lo que resulta en la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.
- 45 50
- Como se demuestra en la presente memoria, un polipéptido de ActRIIb soluble (sActRIIb) es eficaz para aumentar los niveles de reticulocitos *in vivo*, un efecto que, durante un período de tiempo más largo, se espera que provoque un aumento de los niveles de hematocrito. Por tanto, los polipéptidos de sActRIIb de la divulgación se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*. Como se muestra en la presente memoria, los antagonistas de ActRIIb estimulan la eritropoyesis en roedores y monos. Cabe señalar que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una variedad de factores, que incluyen eritropoyetina, G-CSF y homeostasis del hierro. Los términos "aumentar los niveles de glóbulos rojos" y "promover la formación de glóbulos rojos" se refieren a métricas clínicamente observables, tal como hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y mediciones de hemoglobina, y están destinados a ser neutrales en cuanto al mecanismo por el cual se producen dichos cambios.
- 55 60 65
- Además de estimular los niveles de glóbulos rojos, ciertos antagonistas de ActRIIb son útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, la promoción del crecimiento óseo (véase Publicación PCT WO 2006/012627) y promoción del crecimiento muscular (véase Publicación PCT No. WO2006/012627 y Solicitud PCT No. PCT/US2008/001506). Los antagonistas de ActRIIb incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb solubles que se unen a ligandos (por ejemplo, de unión a activina), anticuerpos que se unen a ActRIIb y alteran la unión de activina, proteínas que no son anticuerpos seleccionadas para la unión de ActRIIb (véase por ejemplo, WO/2002/088171, WO/2006/055689y WO/2002/032925 para ejemplos de dichas proteínas y procedimientos para el diseño y selección de las mismas), péptidos aleatorizados seleccionados para la unión de ActRIIb, a menudo fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a ActRIIb se pueden unir para crear una molécula de unión bifuncional. Los aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización de ActRIIb se incluyen como antagonistas de ActRIIb. Varias proteínas tienen antagonistas que pueden ser similares a los antagonistas de ActRIIb, que incluye la inhibina (es decir, la subunidad alfa de inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente la activina en todos los tejidos, folistatina (por ejemplo, Folistatina-288 y folistatina-315), FSRP, FLRG, activina C, alfa (2)-macroglobulina y una activina A mutante

M108A (cambio de metionina por alanina en la posición 108). Generalmente, las formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión al receptor de tipo I, se pueden unir a los receptores de tipo II y no forman un complejo ternario activo, actuando así como antagonistas. Además, los ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, ARNip o ribozimas que inhiben la expresión de ActRIIb, se pueden usar

5 como antagonistas de ActRIIb. El antagonista de ActRIIb que se va a usar puede mostrar selectividad para inhibir la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11.

10 Los términos que se usan en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten más adelante o en otro lugar en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al practicante al describir las composiciones de la invención y procedimientos de la divulgación y como se hacen y se usan. El ámbito o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.

15 "Acerca de" y "aproximadamente" generalmente significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida según la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados ejemplares de error están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente, dentro del 10 %, y con mayor preferencia, dentro del 5 % de un valor dado o rango de valores.

20 Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "acerca de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y con mayor preferencia dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente memoria son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "acerca de" o "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indica expresamente.

25 Los procedimientos de la divulgación pueden incluir etapas de comparar secuencias entre sí, lo que incluye la secuencia de tipo salvaje con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímero, por ejemplo, con el uso de programas de alineación 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 tales alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o delección de residuo, la alineación de secuencia introducirá un "espacio" (típicamente representado por un guion, o "A") en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

30 **35** "Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones de ortografía, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluidas proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos de por ciento de identidad o la presencia de residuos o motivos específicos en las posiciones conservadas.

40 El término "similitud de secuencias," en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

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

50 2. Polipéptidos de ActRIIb

55 En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a polipéptidos de ActRIIb. Como se usa en la presente memoria, el término "ActRIIb" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIb (ActRIIb) de cualquier especie y variantes derivadas de tales proteínas ActRIIb mediante mutagénesis u otra modificación. Se entiende que la referencia a ActRIIb en la presente memoria es 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 actividad de serina/treonina quinasa predicha.

60 El término "polipéptido de ActRIIb" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIb así como a cualquier variante de este (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIb incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIb conocido que tiene una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIb, y opcionalmente al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIb de la invención se puede unir e inhibir la función de una proteína ActRIIb y/o un ligando como activina o

miostatina. Se puede seleccionar un polipéptido de ActRIIb por su actividad en la promoción de la formación de los glóbulos rojos in vivo. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIb incluyen polipéptido precursor de ActRIIb humano (SEQ ID NO: 1) y polipéptidos de ActRIIb humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 8 y 9).

- 5 La secuencia de la proteína precursora de ActRIIb humana es la siguiente:

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQ**
 10 **SGLERCEGEQDKRLHCYASWA**NSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPP
PTAPTLLTVLAYSLLPIGGSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDI
 15 HEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRGFGCVWKAQLMNDFA
 VKIFPLQDKQSWSQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLE
 VELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYL
 20 HEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFLAV
 RFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMY
 AMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEV
 25 VVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGC
 VEERVSLIRRNVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ
 30 ID NO: 1)

El péptido señal está subrayado de forma simple; el dominio extracelular está en negrita y los posibles sitios de glicosilación ligados a N están en recuadros.

- 35 La secuencia polipeptídica procesada (extracelular) soluble de ActRIIb humana es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYAS
 40 WANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
 GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

45 En algunas condiciones, la proteína se puede producir con un "SGR..." secuencia en el N-terminal. La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYAS
 50 WANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
 GNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3)

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

60

65

ES 2 852 699 T3

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTGCCCTCCTCTGGGGATCGC
TGTGGCCCGCTCTGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTG
CATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAG
AGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGC
ACTGCTACGCCTCTGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCT
CGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGAT
AGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACT
TCTGCTGCTGTGAAGGCAACTCTGCAACGAGCGCTTCACTCA
TTTGCCAGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGGCCACCC
CCGACAGCCCCCACCTGCTCACGGTGTGGCTACTCACTGC
TGCCCATGGGGCCTTCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTG
GATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTACGGTCATGTGGACATC
CATGAGGACCCCTGGCCTCCACCACCATCCCCTCTGGTGGCC
TGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGCGCTT
TGGCTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCT
GTCAAGATCTTCCCCTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTG
AACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCT
GCTACAGTTCATGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAA
GTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTCCATGACAAGGGCTCCC
TCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACATGGAACGAACT
GTGTCATGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGCCCTCATACCTG
CATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCAGGGCCACAAGCCGT
CTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAA
GAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTGGCTGGCTGTT
CGATTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGG
TAGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGC
CATCAACTCCAGAGAGATGCCTCCTGCGCATTGACATGTAT
GCCATGGGTTGGTGCTGTGGAGCTTGTCTCGCTGCAAGG
CTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTGAGGA
AGAGATTGCCAGCACCCTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTG
GTGGTGACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAAGATCACTGGT
TGAAACACCCGGGCTGGCCAGCTTGTGGAGGAGCTGCAGGAGGT
GTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTGACCATCGAGGA
GTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGGAGGTGGTCAACGGCA
CTACCTCGGACTGTCTCGTTCCCTGGTACCTCTGTCACCAA
TGTGGACCTGCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID
NO: 4)

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

5 TCTGGCGTGGGAGGGCTGAGACACGGGAGTCATCTACTACA
 10 ACGCCAACCTGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGA
 15 GCGCTGCGAAGGCAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCC
 20 TCCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTAAGAAGG
 25 GCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAAGGCAGGAGTG
 30 TGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGT
 35 GAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGAGG
 40 CTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCC
 45 CACC (SEQ ID NO: 5)

En una realización específica, la invención se refiere a polipéptidos ActRIIb solubles. Como se describe en la presente memoria, el término "polipéptido de ActRIIb soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIb. El término "polipéptido de ActRIIb soluble", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIb así como cualquier variante de esta (que incluye mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido de ActRIIb de unión a ligando (por ejemplo, unión a activina) es uno que conserva la capacidad de unirse a activina, que incluye, por ejemplo, activina AA, AB, BB o formas que incluyen una subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIb de unión a ligando (por ejemplo, unión a activina) se unirá a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menos. El dominio extracelular de una proteína ActRIIb se une a activina y otros ligandos, tales como miostatina, y es generalmente soluble en condiciones fisiológicas y, por tanto, se puede denominar polipéptido de ActRIIb soluble de unión a ligando (por ejemplo, unión de activina). Ejemplos de polipéptidos de ActRIIb solubles que se unen a ligandos (por ejemplo, unión a activina) incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en las SEQ ID NO: 2, 3, 8 y 9. SEQ ID NO: 8 se refiere a ActRIIb-hFc y se describe con más detalle en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos de ActRIIb solubles que se unen a ligandos (por ejemplo, unión a activina) comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIb, por ejemplo, la secuencia líder de melitina de abeja melífera (SEQ ID NO: 11), el tejido líder del activador de plasminógeno (TPA) (SEQ ID NO: 12) o el líder ActRIIb nativo (SEQ ID NO: 13). El polipéptido de ActRIIb-hFc ilustrado en SEQ ID NO: 9 usa un líder TPA.

40 Se proporciona un análisis extenso del análisis de función de estructura de ActRIIb en Patente de EE.UU. de Solicitud 12/012,652. La Figura 1 muestra los aminoácidos que están implicados en el dominio de unión al ligando. Se han definido los residuos de ActRIIb que probablemente estén en contacto con ligandos en el bolsillo de unión. En estas posiciones, se espera que se toleren mutaciones conservadas, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán los 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 serán tolerados en esta posición. Fuera de estos residuos, se espera que las modificaciones sean relativamente bien toleradas, con la condición de que tales alteraciones no alteren la estructura de la proteína en su conjunto. Es fácilmente evidente cuando se altera la estructura de una proteína porque la proteína tenderá a expresarse pobremente o a degradarse en el medio de cultivo. Por tanto, una fórmula general para una variante de proteína ActRIIb activa es una que comprende los aminoácidos 12-82 de la SEQ ID NO: 2 respectivamente, pero opcionalmente comenzando en una posición que varía de 1-5 o 3-5 y terminando en una posición que varía de 110-116 o 110-115, respectivamente, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios de aminoácidos conservados en el bolsillo de unión al ligando y cero, una o más alteraciones no conservadas en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión al ligando. Dicha proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos que retiene más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 2.

60 Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos de ActRIIb cribando polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRIIb. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente con el uso de técnicas conocidas en la técnica tales como la química convencional de fase sólida de Merrifield f-Moc o t-Boc. Los fragmentos se pueden producir (de forma recombinante o mediante síntesis química) y probar para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIb o señalización mediada por activina.

- Se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos de ActRIIb cribando librerías de polipéptidos modificados producidos de forma recombinante a partir de los correspondientes ácidos nucleicos mutagenizados que codifican un polipéptido de ActRIIb. Las variantes se pueden producir y probar para identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIb o señalización mediada por activina. En ciertos casos, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIb comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2 o 3.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- Se pueden generar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido de ActRIIb con fines tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Dichos polipéptidos de ActRIIb modificados, cuando se seleccionan para retener la unión de activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos de ActRIIb de origen natural. Los polipéptidos de ActRIIb modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadas) no tendrá un efecto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ActRIIb da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente mediante la evaluación de la capacidad de la variante del polipéptido de ActRIIb para producir una respuesta en las células de una forma similar al polipéptido de ActRIIb de tipo salvaje.
- En determinadas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIb que alteran la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación ligados a O o N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina comprenden generalmente una secuencia de triplete, asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (donde "X" es cualquier aminoácido) que es específicamente reconocida por enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIb de tipo salvaje (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 posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) dan como resultado la no glicosilación en la secuencia del triplete modificado. Otro medio de aumentar el número de restos de carbohidratos en un polipéptido ActRIIb es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRIIb. En función del modo de acoplamiento utilizado, los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. La eliminación de uno o más restos de carbohidratos presentes en un polipéptido de ActRIIb se puede realizar de forma química y/o enzimática. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de ActRIIb al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La escisión enzimática de restos de carbohidratos en polipéptidos de ActRIIb se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas como lo describen Thotakura y otros. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido de ActRIIb se puede ajustar, según sea apropiado, en función del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir patrones de glicosilación diferentes que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIb para su uso en seres humanos se pueden expresar en una línea celular de mamífero que proporcione una glicosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que también sean útiles otras líneas celulares de expresión en mamíferos. Se pueden usar otras líneas celulares de no mamíferos (por ejemplo, levadura, E. coli, células de insecto) y, en algunos casos, dichas líneas celulares se pueden diseñar para incluir enzimas que confieren patrones de glicosilación de tipo mamífero en las proteínas expresadas.
- Esta divulgación contempla además un procedimiento para generar mutantes, en particular conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido de ActRIIb, así como mutantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito del cribado de tales librerías combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes del polipéptido de ActRIIb que se unen a activina u otros ligandos. A continuación se proporciona una variedad de ensayos de cribado, y tales ensayos se pueden usar para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido de ActRIIb se puede cribar para determinar su capacidad para unirse a un ligando de ActRIIb, para evitar la unión de un ligando de ActRIIb a un polipéptido de ActRIIb o para interferir con la señalización provocada por un ligando de ActRIIb.
- La actividad de un polipéptido de ActRIIb o sus variantes también se puede probar en un ensayo in vivo o basado en células. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido de ActRIIb sobre la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Esto se puede realizar, según sea necesario, en presencia de una o más

proteínas ligando de ActRIIb recombinantes (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido de ActRIIb y/o variantes de este, y opcionalmente, un ligando de ActRIIb. Asimismo, se puede administrar un polipéptido de ActRIIb a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más mediciones de sangre, como el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos.

- 5 Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o generalmente aumentada en relación con un polipéptido de ActRIIb de origen natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semivididas intracelulares dramáticamente diferentes al correspondiente polipéptido de ActRIIb de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que dan como resultado la destrucción o la inactivación de un polipéptido de ActRIIb nativo. Tales variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptidos de ActRIIb modulando la vida media de los polipéptidos de ActRIIb. Por ejemplo, una vida media 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 polipéptido de ActRIIb recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión Fc, se pueden realizar mutaciones en el enlazador (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la vida media de la proteína.
- 10 Se puede producir una librería combinatoria por medio de una librería degenerada de genes que codifican una librería de polipéptidos que incluyen cada uno al menos una parte de las posibles secuencias de polipéptidos de ActRIIb. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se puede ligar enzimáticamente en secuencias génicas de manera que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIb se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación de fagos).
- 15 20 Se puede producir una librería combinatoria por medio de una librería degenerada de genes que codifican una librería de polipéptidos que incluyen cada uno al menos una parte de las posibles secuencias de polipéptidos de ActRIIb. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se puede ligar enzimáticamente en secuencias génicas de manera que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIb se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación de fagos).
- 25 30 Hay muchas formas mediante las cuales se puede generar la librería de homólogos potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos se pueden luego ligar en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura y otros, (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Ámsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura y otros, (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura y otros, (1984) Science 198: 1056; Ike y otros, (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477). Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott y otros, (1990) Science 249: 386-390; Roberts y otros, (1992) PNAS USA 89: 2429-2433; Devlin y otros, (1990) Science 249: 404-406; Cwirla y otros, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como Patentes de EE. UU. No: 5,223,409, 5,198,346 y 5,096,815).
- 35 40 Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una librería combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar y aislar las variantes del polipéptido de ActRIIb de una librería mediante el cribado con el uso de, por ejemplo, mutagénesis de escaneo de alanina y similares (Ruf y otros, (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang y otros, (1994) J. Biol. Chem. 269: 3095-3099; Balint y otros, (1993) Gene 137: 109-118; Grodberg y otros, (1993) Eur. J. Biochem. 218: 597-601; Nagashima y otros, (1993) J. Biol. Chem. 268: 2888-2892; Lowman y otros, (1991) Biochemistry 30: 10832-10838; y Cunningham y otros, (1989) Science 244: 1081-1085), mediante mutagénesis de escaneo de enlazador (Gustin y otros, (1993) Virology 193: 653-660; Brown y otros, (1992) Mol. Cell Biol. 12: 2644-2652; McKnight y otros, (1982) Science 232: 316); mediante mutagénesis de saturación (Meyers y otros, (1986) Science 232: 613); mediante mutagénesis por PCR (Leung y otros, (1989) Method Cell Mol Biol 1: 11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, incluida la mutagénesis química, etc. (Miller y otros, (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener y otros, (1994) Strategies in Mol Biol 7: 32-34). La mutagénesis de escaneo del enlazador, particularmente en un entorno combinatorio, es un procedimiento atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIb.
- 45 50 La librería de genes en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la librería de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad que se desea facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferentes incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.
- 55 60 Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido de ActRIIb se pueden ensayar como se describe en la presente memoria para otras variantes del polipéptido de ActRIIb. Cuando
- 65

se produce un polipéptido de ActRIIb en células escindiendo una forma naciente del polipéptido de ActRIIb, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el plegamiento y/o función correctos de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) que 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 ActRIIb.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de ActRIIb incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ActRIIb y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no están limitados a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humano. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el propósito de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de estas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con un coadyuvante de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de ActRIIb. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como las "secuencias de epítopo", que normalmente son secuencias de péptidos cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las secuencias de epítopo bien conocidas para las que los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y secuencia c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión por proteasa, como el factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo libere las proteínas recombinantes de las mismas. A continuación, las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión mediante una posterior separación cromatográfica. En determinadas realizaciones preferentes, un polipéptido de ActRIIb se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido de ActRIIb in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizador" se entiende cualquier cosa que aumente la vida media en suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, una disminución del aclaramiento mediante el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Los dominios constantes de una inmunoglobulina, particularmente una cadena pesada de IgG, también se pueden usar como dominios estabilizadores. Asimismo, las fusiones con albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como una estimulación adicional del crecimiento muscular).

Como ejemplo específico, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIb que se fusiona a un dominio Fc (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 6):

40 SGRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT
 IELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG
 GPEVTYEPPPTAPTGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEV
45 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
50 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)

55 A continuación se muestra un ejemplo de un dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 7).

55 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVD (A) VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKAL
60 PVPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAWEWESN
 GQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYT
 QKSLSLSPGK*

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fcy en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad de unión al receptor Fc relacionado con el MHC de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. También se pueden usar dominios Fc de IgG2, IgG3 e IgG4.

Se entiende que se pueden disponer diferentes elementos de las proteínas de fusión de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIb se puede colocar en el extremo C-terminal de un dominio heterólogo o, alternativamente, un dominio heterólogo se puede colocar en el extremo C-terminal en un polipéptido de ActRIIb. No es necesario que el dominio del polipéptido de ActRIIb y el dominio heterólogo sean adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en el extremo C o N-terminal en cualquier dominio o entre los dominios.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIb de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de ActRIIb. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la vida media in vitro de los polipéptidos de ActRIIb, mejoran la vida media circulatoria de los polipéptidos de ActRIIb o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de ActRIIb. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de fusión (que incluye, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de ActRIIb y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de ActRIIb) y modificaciones del resto de carbohidrato (que incluye, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidrato de un polipéptido de ActRIIb). Como se usa en la presente memoria, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de carbohidrato o un resto no proteico, tal como polietilenglicol.

En determinadas realizaciones, la presente invención pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de ActRIIb, que se aíslan de, o de otra manera sustancialmente libres de, otras proteínas. Los polipéptidos de ActRIIb generalmente se producirán mediante expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de ActRIIb

La divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRIIb (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb solubles y de longitud completa), lo que incluye fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión divulgadas en la presente memoria. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIb humano de origen natural, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIb. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en procedimientos para preparar polipéptidos de ActRIIb o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

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

La divulgación proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 4, 5 o 10. Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a las SEQ ID NO: 4, 5 o 10 y variantes de SEQ ID NO: 4, 5 o 10 también están dentro del ámbito de esta divulgación. En divulgaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga o en una librería de ADN.

En otras divulgaciones, los ácidos nucleicos también incluyen secuencias de nucleótidos y los polipéptidos de ActRIIb codificados por tales ácidos nucleicos, que se hibridan en condiciones muy rigurosas con la secuencia de nucleótidos designada en las SEQ ID NO: 4, 5 o 10, la secuencia complementaria de las SEQ ID NO: 4, 5 o 10, o fragmentos de cualquiera de los anteriores. Como se discutió anteriormente, un experto en la técnica comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se 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 una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C hasta una rigurosidad alta 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 se pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras

se cambia la otra variable. La divulgación proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

- 5 Ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se establece en las SEQ ID NO: 4, 5 o 10 debido a degeneración en el código genético también están dentro del ámbito de la divulgación. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan con más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden producir mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión entre las células de mamífero. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas estas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del ámbito de esta divulgación.
- 10 15 En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención se pueden unir operativamente a una o más secuencias reguladoras de nucleótidos en una construcción de expresión. Las secuencias reguladoras de nucleótidos serán generalmente apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Normalmente, dichas una o más secuencias reguladoras de nucleótidos pueden incluir, pero no están limitadas a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. La invención contempla los promotores constitutivos o inducibles conocidos en la técnica. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula de un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión se puede insertar en un cromosoma. En una realización preferente, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 1

incluye los retrovirales) en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los distintos procedimientos que se emplean en la preparación de los plásmidos y en la transformación de los organismos huésped se conocen bien en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como células eucariotas, así como también procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A

5 Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene β -gal).

10 En una realización preferente, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise.). Como resultará evidente, las construcciones génicas en cuestión se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, que incluye proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

15 Esta divulgación también se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificadora (por ejemplo, las SEQ ID NO: 4, 5 o 10) para uno o más de los polipéptidos de ActRIIb en cuestión. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIb de la invención se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, con el uso de un sistema de expresión de baculovirus), células de levadura o de mamífero. Otras células huésped adecuadas se conocen por aquellas personas expertas en la técnica.

20 25 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere además a procedimientos para producir los polipéptidos de ActRIIb en cuestión. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRIIb se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido de ActRIIb. El polipéptido de ActRIIb se puede secretar y aislar de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de ActRIIb. Alternativamente, el polipéptido de ActRIIb se puede retener citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se recolectan, se lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos de ActRIIb en cuestión se pueden aislar del medio de cultivo celular, células huésped o ambos, utilizando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, lo que incluye cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoafinidad 30 35 con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de ActRIIb y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido de ActRIIb (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIb-Fc). En una realización preferente, el polipéptido de ActRIIb es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferente, la purificación se logra mediante una serie de pasos 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 se podría completar con filtración viral e intercambio de tampón.

40 45 En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, como una secuencia del sitio de escisión de poli (His)/enteroquinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido de ActRIIb recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad con el uso de una resina de metal Ni²⁺. La secuencia líder de purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido de ActRIIb purificado (por ejemplo, véase Hochuli y otros, (1987) J. Chromatography 411: 177; y Janknecht y otros, PNAS USA 88: 8972).

50 55 60 50 Las técnicas para fabricar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para la ligazón, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligazón enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente se pueden hibridar para generar una secuencia de genes químéricos (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y otros, John Wiley & Sons: 1992).

4. Antagonistas alternativos de ActRIIb

65 Como se demuestra en la presente memoria, un polipéptido de ActRIIb es eficaz para aumentar los niveles de reticulocitos in vivo, un efecto que, durante un período de tiempo más largo, conduce a niveles aumentados de hematocrito en ciertas especies, y es probable que lo haga en humanos. Por tanto, en algunas realizaciones, los

antagonistas de ActRIIb de la divulgación se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos in vivo. Aunque los polipéptidos de ActRIIb solubles, y particularmente ActRIIb-Fc, son antagonistas preferentes, y aunque tales antagonistas pueden afectar los niveles de glóbulos rojos a través de un mecanismo diferente al antagonismo de activina (por ejemplo, la inhibición de activina puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de moléculas, que incluye, quizás, otros miembros de la superfamilia TGF-beta, y tal inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado sobre la hematopoyesis), se espera que sean útiles otros tipos de antagonistas de ActRIIb, lo que incluye los anticuerpos anti-ActRIIb, ácidos nucleicos antisentido, ARNi o ribozima que inhiben la producción de ActRIIb, y otros inhibidores de ActRIIb, particularmente aquellos que interrumpen la unión de ActRIIb.

5

10

Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido de ActRIIb (por ejemplo, un polipéptido de ActRIIb soluble) y que se une competitivamente al ligando con el polipéptido de ActRIIb o inhibe de otro modo la señalización mediada por ActRIIb se puede usar como un antagonista de las actividades del polipéptido de ActRIIb.

15

20

Mediante el uso de inmunógenos derivados de un polipéptido ActRIIb, se pueden preparar antisueros anti-proteína/anti-peptido o anticuerpos monoclonales mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. de Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Se puede inmunizar un mamífero, como un ratón, un hámster o un conejo con una forma inmunogénica del polipéptido de ActRIIb, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen la conjugación con portadores u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Se puede administrar una porción inmunogénica de un polipéptido de ActRIIb en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede controlar mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Se pueden usar ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

25

30

35

Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido de ActRIIb, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recolectar de un animal inmunizado y fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizantes como células de mieloma para producir células de hibridoma. Tales técnicas se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros, (1983) *Immunology Today* 4: 72) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Las células de hibridoma se pueden cribar inmunquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de ActRIIb y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

40

45

50

El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria pretende incluir anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos o dominios de inmunoglobulinas que son reactivos con un antígeno seleccionado. Los anticuerpos se pueden fragmentar con el uso de técnicas convencionales y los fragmentos se pueden cribar para determinar su utilidad y/o interacción con un epítopo específico de interés. Por tanto, el término incluye segmentos de porciones de una molécula de anticuerpo escindidas proteolíticamente o preparadas de forma recombinante que son capaces de reaccionar selectivamente con una determinada proteína. Los ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')², Fab', Fv y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio V [L] y/o V [H] unido mediante un enlazador peptídico. Los scFv pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión. El término anticuerpo también incluye preparaciones policlonales, monoclonales u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. El término "anticuerpo recombinante" significa un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina, expresado a partir de un ácido nucleico que se ha construido utilizando técnicas de biología molecular, tal como un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano desarrollado a partir de una sola cadena de anticuerpo. Los anticuerpos de dominio único y de cadena única también se incluyen dentro del término "anticuerpo recombinante".

55

60

65

En ciertos casos, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo monoclonal y, en ciertos casos, la divulgación pone a disposición procedimientos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un procedimiento para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de ActRIIb puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido antigénico eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obteniendo células productoras de anticuerpos (por ejemplo, células del bazo) del ratón y fusionando las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y probar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células derivadas del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal se puede purificar del cultivo celular.

65

El adjetivo "específicamente reactivo con" como se usa en referencia a un anticuerpo pretende significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido de ActRIIb) y otros antígenos que no son de interés para lo que se utiliza el anticuerpo, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos

5 procedimientos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, se puede desear un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo: antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con un rango de afinidades diferentes, los anticuerpos generalmente preferentes tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M o menos.

10 Además, las técnicas utilizadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo que se desea pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unir un antígeno en solución, se puede desear probar la unión de la solución. Hay una variedad de técnicas diferentes disponibles para probar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos tipo sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de 20 inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

25 Los ejemplos de categorías de compuestos de ácido nucleico que son antagonistas de ActRIIb incluyen ácidos nucleicos antisentido, construcciones de ARNi y construcciones de ácidos nucleicos catalíticos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto bicatenario también puede incluir regiones en voladizo o sin complementariedad, donde una u otra de las cadenas es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, lo que significa que el compuesto forma una estructura denominada "horquilla" o "tallo-bucle", con una región de estructura de doble hélice. Un compuesto de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región que consiste en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 25, 22, 20, 18 o 15 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de ActRIIb de longitud completa. La región de complementariedad será preferentemente de al menos 8 nucleótidos y, opcionalmente, de aproximadamente 18 a 35 nucleótidos. Una región de complementariedad puede caer dentro de un intrón, una secuencia codificadora o una secuencia no codificadora del transcripto diana, tal como la porción de la secuencia codificadora. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de 30 longitud y, opcionalmente, la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para su uso como antisentido), ARN o híbrido de ARN: ADN. Cualquier hebra puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como ADN o ARN. Asimismo, un compuesto de doble hebra puede ser ADN: ADN, ADN: ARN o ARN: ARN, y cualquier hebra también puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden 40 clasificar fácilmente como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, lo que incluye una o modificaciones en el esqueleto (la parte de azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, lo que incluye los enlaces internucleotídicos) o la parte de la base (la parte de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico antisentido preferentemente tendrá una longitud de 45 aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y, a menudo, contendrá una o más modificaciones para mejorar características tales como la estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar donde es probable que se administre el compuesto, tal como el estómago en el caso de compuestos que se administran por vía oral y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de una construcción de ARNi, la cadena complementaria al transcripto diana será generalmente ARN o modificaciones de este. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción dúplex de la construcción de ARNi de "horquilla" bicatenaria o monocatenaria tendrá 50 generalmente una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, siempre que sirva como sustrato de Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y también pueden contener formas modificadas. Los compuestos de ácido nucleico pueden inhibir la expresión de la diana en aproximadamente un 50 %, 75 %, 90 % o más cuando se ponen en contacto con células en condiciones fisiológicas y en una concentración en la que un control de sentido o sin sentido tiene poco o ningún efecto. Las concentraciones preferentes para probar el efecto de los compuestos de ácido nucleico son 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácido nucleico también se pueden analizar para 55 determinar sus efectos, por ejemplo, en los niveles de glóbulos rojos.

60 En la divulgación, se pueden usar antagonistas alternativos con propiedades similares a los antagonistas de ActRIIb. Un antagonista puede ser un polipéptido de folistatina que antagoniza la bioactividad de activina y/o se une a activina y/o miostatina. El término "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de folistatina de origen natural así como cualquier variante de este (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcional de folistatina. Se pueden identificar variantes de polipéptidos de folistatina que retienen las 65 propiedades de unión de activina en base a estudios previos que involucran interacciones de folistatina y activina. Por ejemplo, WO2008/030367 divulga dominios de folistatina específicos ("FSD") que se muestra que son

importantes para la unión de activina. Como se muestra a continuación en las SEQ ID NO: 18-20, el dominio de folistatina N-terminal ("FSND" SEQ ID NO: 18), FSD2 (SEQ ID NO: 19) y, en menor medida, FSD1 (SEQ ID NO: 20) representan dominios ejemplares dentro de la folistatina importantes para la unión a activina. Además, los procedimientos para preparar y probar librerías de polipéptidos se describieron anteriormente en el contexto de polipéptidos de ActRIIb y dichos procedimientos también pertenecen a la preparación y prueba de variantes de folistatina. Además, también se conocen formas de folistatina que se unen preferentemente a miostatina (con unión de activina reducida) y se pueden usar como antagonistas en la presente memoria que pueden exhibir propiedades similares a las de los antagonistas de ActRIIb; tales formas de folistatina se pueden encontrar en, por ejemplo, WO/2005/100563 y WO/2008/030367). Los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina y, opcionalmente, al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor identidad. Ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de folistatina humana (SEQ ID NO: 16) como se describe, por ejemplo, en WO2005/025601.

15 La isoforma FST344 del polipéptido precursor de folistatina humana es la siguiente:

MVRARHQPGGLCLLLLLLQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQV

20 LYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC

I PCKETCENVDCPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVC

25 GLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGS

STCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHL

RKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR

30 GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL

EVKHSGSCN**SISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW** (SEQ ID

35 NO: 16; NP_037541.1 ISOFORMA DE FOLISTATINA FST344)

El péptido señal está subrayado de forma simple; los últimos 27 residuos en negrita representan aminoácidos adicionales en comparación con una isoforma de folistatina más corta FST317 (NP_006341) a continuación.

40 La isoforma FST317 del polipéptido precursor de folistatina humana es la siguiente:

MVRARHQPGGLCLLLLLLQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQV

LYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC

I PCKETCENVDCPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVC

GLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGS

STCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHL

RKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR

GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL

55 EVKHSGSCN (SEQ ID NO: 17)

El péptido señal está subrayado de forma simple.

60 La secuencia del dominio de folistatina N-terminal (FSND) es la siguiente:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDN

65 TLFKWMIFNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 18; FSND)

Las secuencias FSD1 y FSD2 son las siguientes:

ETCENVDCPGKKCRMNNKPRCV (SEQ ID NO: 19; FSD1)
KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVT (SEQ ID NO: 20; FSD2)

- 5 En otras divulgaciones, un antagonista similar a un antagonista de ActRIIb puede ser un gen relacionado con folistatina (FLRG) que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se une a la activina. El término "polipéptido FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de FLRG de origen natural así como cualquier variante de este (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil.
- 10 Las variantes de polipéptidos FLRG que conservan las propiedades de unión de activina o miostatina se pueden identificar con el uso de procedimientos de rutina para ensayar las interacciones de FLRG y activina o miostatina. Véase, por ejemplo, US 6,537,966. Además, los procedimientos para preparar y probar librerías de polipéptidos se describieron anteriormente en el contexto de polipéptidos de ActRIIb y dichos procedimientos también pertenecen a la producción y prueba de variantes de FLRG. Los polipéptidos de FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocido que tiene una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG, y opcionalmente al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor identidad.
- 15

El polipéptido precursor de FLRG humano es el siguiente:

20 MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGFVSSMGSNPAPGGVCWLQQQQ
EATCSVLQTDVTTRAECASGNIDTAWSNLTHPGNキンLLGFLG
LVHCLPCKDSCDGVECGPGKACRMLGGRPRCEAPDCSGLPARL
25 QVCGSDGATYRDECCELRAARCRGHPDLSVMYRGRCRKSCHEHVVC
PRPQSCVVDQTGSAHCVVCRAAPCVPSSPGQELCGNNNVTYISS
30 CHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPEEPGGESAEEEENFV
(SEQ ID NO: 21; NP_005851)

- 35 El péptido señal está subrayado de forma simple.

En ciertas divulgaciones, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG incluyen proteína de fusión que tiene al menos una porción de los polipéptidos de folistatina o polipéptidos de FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que facilitan el aislamiento, detección, estabilización o multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se analizaron en detalle anteriormente con referencia a los polipéptidos de ActRIIb. En una divulgación, un antagonista es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a ligando (por ejemplo, unión a activina) de un polipéptido de folistatón fusionado a un dominio Fc. En otra divulgación, un antagonista es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a ligando (por ejemplo, unión a activina) de un polipéptido de FLRG fusionado a un dominio Fc. Se ha demostrado en la bibliografía, y por los solicitantes con respecto a FLRG, que folistatina y FLRG tienen afinidades por la activina A en el rango de picomolar, lo que indica que estos agentes inhibirán la señalización de la activina A en un grado similar al de ActRIIb-Fc.

5. Ensayos de cribado

50 En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere al uso de polipéptidos de ActRIIb y polipéptidos de activina para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de ActRIIb. Los compuestos identificados a través de este cribado se pueden probar para evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos se pueden probar, por ejemplo, en modelos animales.

60 Existen numerosos enfoques para el cribado de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina dirigiéndose a la señalización de activina, miostatina (u otros ligandos) y ActRIIb. En ciertas divulgaciones, se puede llevar a cabo un cribado de compuestos de alto rendimiento para identificar agentes que perturban los efectos mediados por activina/miostatina o ActRIIb en una línea celular seleccionada. En ciertas divulgaciones, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido de ActRIIb a activina, miostatina u otros ligandos. Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido de ActRIIb a activina, miostatina u otros ligandos. En una divulgación adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con una activina o polipéptido de ActRIIb.

- Será suficiente una variedad de formatos de ensayo y, a la luz de la presente divulgación, los que no se describen expresamente en la presente memoria serán comprendidos, no obstante, por un experto en la técnica. Como se describe en la presente memoria, los compuestos de prueba (agentes) de la divulgación se pueden crear mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas de origen natural que se sintetizan in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) que se van a probar para determinar su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento tisular se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), que se producen químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos los peptidomiméticos) o que se producen de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados por la presente divulgación incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En una divulgación específica, el agente de prueba es una pequeña molécula orgánica que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 Dalton.
- Los compuestos de prueba de la divulgación se pueden proporcionar como entidades individuales discretas, o se pueden proporcionar en librerías de mayor complejidad, tales como las preparadas mediante química combinatoria. Estas librerías pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de cribado. Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar opcionalmente con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticulantes fotoactivables o cualquier combinación de estos.
- En muchos programas de cribado de fármacos que analizan librerías de compuestos y extractos naturales, se desean ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos examinados en un período de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, como los que se pueden derivar con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como cribados "primarios", ya que se pueden generar para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediado por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de prueba generalmente se pueden ignorar en el sistema in vitro, centrándose el ensayo principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular, como se puede manifestar en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido de ActRIIb y un ligando como activina o miostatina.
- Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado ejemplar de la presente divulgación, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido de ActRIIb aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a un ligando tal como activina o miostatina. A la mezcla del compuesto y el polipéptido de ActRIIb se añade luego una composición que contiene un ligando de ActRIIb. La detección y cuantificación de los complejos ActRIIb/ligando (por ejemplo, activina, miostatina) proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido de ActRIIb y un ligando. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos con el uso de diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido de ActRIIb, y se cuantifica la formación del complejo ActRIIb/ligando en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos se puede variar y se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para producir un sistema de ensayo sin células adecuado.
- La formación de complejos entre el polipéptido de ActRIIb y la activina se puede detectar mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar con el uso de, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable tales como radiomarcadas (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C o ³H), polipéptido o ligando de ActRIIb marcado con fluorescencia (por ejemplo, FITC) o marcado enzimáticamente, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.
- La presente divulgación contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, tanto directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido de ActRIIb y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como aquellos en base a guías de ondas ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de EE.UU. No 5.677.196), resonancia de plasmón de superficie (SPR), sensores de carga de superficie y sensores de fuerza de superficie, son compatibles con la presente divulgación.
- Además, la presente divulgación contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido de ActRIIb y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No 5,283,317; Zervos y otros. (1993) Cell 72:223-232; Madura y otros (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel y otros. (1993) Biotechniques 14: 920-924.; y Iwabuchi y otros. (1993) Oncogene 8:1693-1696). La presente divulgación contempla el uso de dos sistemas

híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian interacciones entre un polipéptido de 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 Patente de EE.UU. No. 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

- 5 En ciertos casos, los compuestos en cuestión se identifican mediante su capacidad para interactuar con un polipéptido de ligando o ActRIIb de la divulgación. La interacción entre el compuesto y el ActRIIb o el polipéptido ligando puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de proteína con el uso de procedimientos bioquímicos in vitro, que incluyen foto-reticulación, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB y otros, 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos se pueden cribar en un ensayo basado en mecanismos, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un ligando o polipéptido de ActRIIb. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido de ActRIIb se puede transfectar con un sistema indicador (por ejemplo, β-galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y, opcionalmente, se criba contra la librería mediante un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la librería. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, perla o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar normalmente con el uso de resonancia colorimétrica o de fluorescencia o plasmón superficial.
- 10
- 15
- 20

6. Usos terapéuticos ejemplares

En determinadas realizaciones, las composiciones para su uso que comprenden antagonistas de ActRIIb (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb) de la presente invención se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates, y particularmente en pacientes humanos. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos de tratamiento o prevención de la anemia en un individuo que lo necesite administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de ActRIIb, tal como un polipéptido de ActRIIb. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para promover la formación de glóbulos rojos en un individuo administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de ActRIIb, particularmente un polipéptido de ActRIIb. Estos procedimientos se pueden utilizar para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos y, en particular, de seres humanos.

Como se usa en la presente memoria, un terapéutico que "previene" una trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la ocurrencia del trastorno o afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control no tratada, o retrase el inicio o reduzca la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con respecto a la muestra de control no tratada. El término "tratar", como se usa en la presente memoria, incluye la profilaxis de la afección mencionada o 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 proveedor de atención médica y el resultado previsto de la administración del agente terapéutico.

Como se muestra en la presente memoria, los antagonistas de ActRIIb se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y tales antagonistas se pueden usar en poblaciones de pacientes seleccionadas. Ejemplos de poblaciones de pacientes apropiadas incluyen aquellos con niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como pacientes que tienen anemia, y aquellos que están en riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales 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 una realización, un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos se trata con un antagonista de ActRIIb para aumentar los niveles de glóbulos rojos, y luego se extrae sangre y se almacena para su uso posterior en transfusiones.

Como se describe en los ejemplos, los antagonistas de ActRIIb pueden estimular la producción de glóbulos rojos mediante la activación de la eritropoyesis esplénica. Este mecanismo novedoso indica que es probable que estos antagonistas trabajen sinéricamente con otros tratamientos de la anemia, tales como los agonistas de eritropoyetina (por ejemplo, EpoGen, Procrit, Aranesp, imitadores de Epo, agonistas del receptor de Epo, etc.).

Los antagonistas de ActRIIb divulgados en la presente memoria, y en particular las proteínas ActRIIb-Fc, se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel inferior al normal para la categoría de edad y sexo adecuada 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 en general. Las posibles causas incluyen pérdida de sangre, déficits nutricionales, reacción a medicamentos, varios problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, mielofibrosis, 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 Hodgkin y Hodgkin); tumores del sistema hematopoyético (por ejemplo, leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (por ejemplo, regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunes, que incluyen, pero no están limitadas a, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); insuficiencia o enfermedad renal aguda o crónica, que incluyen afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; sangrado agudo o crónico; situaciones en las que la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a anticuerpos o autoanticuerpos del paciente y/o por razones religiosas (por ejemplo, algunos testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, anemia 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 de edad avanzada o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones sobre la sobrecarga circulatoria.
- 5 Los antagonistas de ActRIIb (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb) serían apropiados para tratar anemias de médula ósea hipoproliferativa, que normalmente se asocian con pocos cambios en la morfología de los eritrocitos. 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 *inapropiadamente bajos* para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen: 4) anemia ferropénica en etapa temprana y 5) anemia provocada por daño a la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son *apropiadamente elevados* para el grado de anemia observado.
- 10 15 El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que abarca inflamación, infección, lesión tisular y afecciones tales como el cáncer, y se distingue por niveles bajos de eritropoyetina y una *respuesta inadecuada* a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, págs. 628-634). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunas se asocian con el proceso de la enfermedad en sí y la generación de citocinas inflamatorias como la interleucina-1, el interferón-gamma y el factor de necrosis tumoral (Bron y otros, 2001, Semin Oncol 28 (Supl 8): 1-6). Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido regulador del hierro clave hepcidina, inhibiendo así la exportación de hierro de los macrófagos y limitando en general la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18: 394-400). La pérdida de sangre a través de varias vías 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, que incluyen fatiga y reducción de la calidad de vida, reducción de la eficacia del tratamiento y aumento de la mortalidad.
- 20 25 30 35 La enfermedad renal crónica se asocia con anemia hipoproliferativa que varía en gravedad con el grado de insuficiencia renal. Tal anemia se debe principalmente a una *producción inadecuada* de eritropoyetina y reducción de la supervivencia de los glóbulos rojos. La enfermedad renal crónica generalmente avanza gradualmente durante un período de años o décadas hasta 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 proceso y empeora a medida que avanza la enfermedad. Las consecuencias clínicas de la anemia por enfermedad renal están bien documentadas e incluyen el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, deterioro de la función cognitiva, reducción de la calidad de vida y alteración de la función inmunitaria (Levin y otros, 1999, Am J Kidney Dis 27: 347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20 (Suppl 1): 21-24; Revicki y otros, 1995, Am J Kidney Dis 25: 548-554; Gafter y otros, 1994, Kidney Int 45: 224-231.).
- 40 45 50 55 Muchas condiciones que resultan en una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa de leve a moderada. Entre tales condiciones se encuentran los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, la anemia puede ocurrir en la enfermedad de Addison, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo o en varones castrados o tratados con estrógenos. La anemia de leve a moderada también puede ocurrir con una ingesta dietética reducida de proteínas, una condición particularmente prevalente en los ancianos. Finalmente, la anemia se puede desarrollar en pacientes con enfermedad hepática crónica que surge de casi cualquier causa (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, págs. 628-634).
- 60 65 La anemia por deficiencia de hierro es la etapa final en una progresión gradual de aumento de la deficiencia de hierro que incluye un balance de hierro negativo y eritropoyesis por deficiencia de hierro como etapas intermedias. La deficiencia de hierro puede resultar de una mayor demanda de hierro, una disminución de la ingesta de hierro o una mayor pérdida de hierro, como se ejemplifica en condiciones tales como embarazo, dieta inadecuada, malabsorción intestinal, inflamación aguda o crónica y pérdida de sangre aguda o crónica. Con anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea permanece hipoproliferativa y la morfología de los eritrocitos es en gran parte normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede producir algunos eritrocitos microcíticos hipocrómicos, y la transición a una anemia grave por deficiencia de hierro se acompaña de hiperproliferación de la médula ósea y mayor prevalencia de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, págs. 628-634). El tratamiento apropiado para la anemia por deficiencia

de hierro depende de su causa y gravedad, con preparaciones de hierro por vía oral, formulaciones de hierro parenteral y transfusión de glóbulos rojos como las principales opciones convencionales. Un polipéptido de ActRIIb, u otro antagonista de ActRIIb, se podría usar para tratar anemias crónicas por deficiencia de hierro solo o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

- 5** Las anemias hipoproliferativas pueden ser el resultado de una disfunción primaria o insuficiencia de la médula ósea, en lugar de una disfunción secundaria a inflamación, infección o progresión del cáncer. Ejemplos destacados serían la mielosupresión provocada por fármacos quimioterápicos contra el cáncer o radioterapia contra el cáncer. Una revisión amplia de ensayos clínicos encontró que la anemia leve puede ocurrir en el 100 % de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que la anemia más severa puede ocurrir en hasta el 80 % de tales pacientes Groopman y otros, 1999, J Natl Cancer Inst 91: 1616-1634). Los fármacos mielosupresores incluyen: 1) agentes alquilantes tales como 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 antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina); 4) inhibidores de quinasas (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 la topoisomerasa (por ejemplo, topotecán y etopósido). Se puede usar un polipéptido de ActRIIb, u otro antagonista de ActRIIb, para tratar la anemia provocada por agentes quimioterápicos y/o radioterapia.
- 10** Los antagonistas de ActRIIb (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb) también serían apropiados para el tratamiento de anemias por maduración desordenada de glóbulos rojos, que se caracterizan en parte por glóbulos rojos de tamaño insuficiente (microcíticos), sobredimensionados (macrocíticos), deformados o de color anormal (hipocrómicos).
- 15** Los pacientes se pueden tratar 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 11,0 g/dl (véase también Jacobs y otros (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), aunque los niveles objetivo más bajos pueden provocar menos efectos secundarios cardiovasculares u otros. Alternativamente, los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupada por las células) se pueden usar como una medida del estado de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos oscilan entre el 41 y el 51 % para los hombres adultos y entre el 35 y el 45 % para las mujeres adultas. Los niveles de hematocrito objetivo suelen rondar el 30-33 %. Además, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por tanto, de manera óptima, el nivel de hemoglobina/hematocrito objetivo se puede individualizar para cada paciente.
- 20** Los antagonistas de ActRIIb descritos en la presente memoria pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a Epo. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIb puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis normal o aumentada (> 300 UI/kg/semana) de Epo no da como resultado el aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel objetivo. Los pacientes con una respuesta Epo inadecuada se encuentran para todos los tipos de anemia, pero se ha observado un mayor número de no respondedores con especial frecuencia en pacientes con cánceres y pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. Una respuesta inadecuada a Epo puede ser tanto constitutiva (es decir, observada en el primer tratamiento con Epo) o adquirida (por ejemplo, observada después de un tratamiento repetido con Epo).
- 25** Los antagonistas de ActRIIb también se pueden usar para tratar a pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de Epo. Los principales efectos adversos de Epo son un aumento excesivo de 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 Epo que se han informado, algunos de los cuales están relacionados con la hipertensión, son dolores de cabeza, síndrome pseudogripal, obstrucción de derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debidas a trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplasia de glóbulos rojos (Singibarti, (1994) J. Clin Investig 72 (supl 6), S36-S43; Horl y otros (2000) Nephrol Dial Transplant 15 (supl 4), 51-56; Delanty y otros (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346 (7), 522-523).
- 30** Como se describe en la Publicación de EE. UU. No. 2009/0005308, los antagonistas de ActRIIb se pueden utilizar para promover el crecimiento muscular y aumentar la fuerza muscular. Por lo tanto, los antagonistas de ActRIIb se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos y promover el crecimiento muscular. Por lo tanto, los antagonistas de ActRIIb pueden ser particularmente útiles para pacientes con un trastorno asociado con pérdida de masa muscular y anemia. Los ejemplos incluyen el cáncer y los tratamientos contra el cáncer, muchas formas de caquexia (desgaste muscular) y sarcopenia (pérdida muscular asociada con el envejecimiento).
- 35**
- 40**
- 45**
- 50**
- 55**
- 60**
- 65**
- 70**
- 75**
- 80**
- 85**
- 90**
- 95**
- 100**
- 105**
- 110**
- 115**
- 120**
- 125**
- 130**
- 135**
- 140**
- 145**
- 150**
- 155**
- 160**
- 165**
- 170**
- 175**
- 180**
- 185**
- 190**
- 195**
- 200**
- 205**
- 210**
- 215**
- 220**
- 225**
- 230**
- 235**
- 240**
- 245**
- 250**
- 255**
- 260**
- 265**
- 270**
- 275**
- 280**
- 285**
- 290**
- 295**
- 300**
- 305**
- 310**
- 315**
- 320**
- 325**
- 330**
- 335**
- 340**
- 345**
- 350**
- 355**
- 360**
- 365**
- 370**
- 375**
- 380**
- 385**
- 390**
- 395**
- 400**
- 405**
- 410**
- 415**
- 420**
- 425**
- 430**
- 435**
- 440**
- 445**
- 450**
- 455**
- 460**
- 465**
- 470**
- 475**
- 480**
- 485**
- 490**
- 495**
- 500**
- 505**
- 510**
- 515**
- 520**
- 525**
- 530**
- 535**
- 540**
- 545**
- 550**
- 555**
- 560**
- 565**
- 570**
- 575**
- 580**
- 585**
- 590**
- 595**
- 600**
- 605**
- 610**
- 615**
- 620**
- 625**
- 630**
- 635**
- 640**
- 645**
- 650**
- 655**
- 660**
- 665**
- 670**
- 675**
- 680**
- 685**
- 690**
- 695**
- 700**
- 705**
- 710**
- 715**
- 720**
- 725**
- 730**
- 735**
- 740**
- 745**
- 750**
- 755**
- 760**
- 765**
- 770**
- 775**
- 780**
- 785**
- 790**
- 795**
- 800**
- 805**
- 810**
- 815**
- 820**
- 825**
- 830**
- 835**
- 840**
- 845**
- 850**
- 855**
- 860**
- 865**
- 870**
- 875**
- 880**
- 885**
- 890**
- 895**
- 900**
- 905**
- 910**
- 915**
- 920**
- 925**
- 930**
- 935**
- 940**
- 945**
- 950**
- 955**
- 960**
- 965**
- 970**
- 975**
- 980**
- 985**
- 990**
- 995**
- 1000**
- 1005**
- 1010**
- 1015**
- 1020**
- 1025**
- 1030**
- 1035**
- 1040**
- 1045**
- 1050**
- 1055**
- 1060**
- 1065**
- 1070**
- 1075**
- 1080**
- 1085**
- 1090**
- 1095**
- 1100**
- 1105**
- 1110**
- 1115**
- 1120**
- 1125**
- 1130**
- 1135**
- 1140**
- 1145**
- 1150**
- 1155**
- 1160**
- 1165**
- 1170**
- 1175**
- 1180**
- 1185**
- 1190**
- 1195**
- 1200**
- 1205**
- 1210**
- 1215**
- 1220**
- 1225**
- 1230**
- 1235**
- 1240**
- 1245**
- 1250**
- 1255**
- 1260**
- 1265**
- 1270**
- 1275**
- 1280**
- 1285**
- 1290**
- 1295**
- 1300**
- 1305**
- 1310**
- 1315**
- 1320**
- 1325**
- 1330**
- 1335**
- 1340**
- 1345**
- 1350**
- 1355**
- 1360**
- 1365**
- 1370**
- 1375**
- 1380**
- 1385**
- 1390**
- 1395**
- 1400**
- 1405**
- 1410**
- 1415**
- 1420**
- 1425**
- 1430**
- 1435**
- 1440**
- 1445**
- 1450**
- 1455**
- 1460**
- 1465**
- 1470**
- 1475**
- 1480**
- 1485**
- 1490**
- 1495**
- 1500**
- 1505**
- 1510**
- 1515**
- 1520**
- 1525**
- 1530**
- 1535**
- 1540**
- 1545**
- 1550**
- 1555**
- 1560**
- 1565**
- 1570**
- 1575**
- 1580**
- 1585**
- 1590**
- 1595**
- 1600**
- 1605**
- 1610**
- 1615**
- 1620**
- 1625**
- 1630**
- 1635**
- 1640**
- 1645**
- 1650**
- 1655**
- 1660**
- 1665**
- 1670**
- 1675**
- 1680**
- 1685**
- 1690**
- 1695**
- 1700**
- 1705**
- 1710**
- 1715**
- 1720**
- 1725**
- 1730**
- 1735**
- 1740**
- 1745**
- 1750**
- 1755**
- 1760**
- 1765**
- 1770**
- 1775**
- 1780**
- 1785**
- 1790**
- 1795**
- 1800**
- 1805**
- 1810**
- 1815**
- 1820**
- 1825**
- 1830**
- 1835**
- 1840**
- 1845**
- 1850**
- 1855**
- 1860**
- 1865**
- 1870**
- 1875**
- 1880**
- 1885**
- 1890**
- 1895**
- 1900**
- 1905**
- 1910**
- 1915**
- 1920**
- 1925**
- 1930**
- 1935**
- 1940**
- 1945**
- 1950**
- 1955**
- 1960**
- 1965**
- 1970**
- 1975**
- 1980**
- 1985**
- 1990**
- 1995**
- 2000**
- 2005**
- 2010**
- 2015**
- 2020**
- 2025**
- 2030**
- 2035**
- 2040**
- 2045**
- 2050**
- 2055**
- 2060**
- 2065**
- 2070**
- 2075**
- 2080**
- 2085**
- 2090**
- 2095**
- 2100**
- 2105**
- 2110**
- 2115**
- 2120**
- 2125**
- 2130**
- 2135**
- 2140**
- 2145**
- 2150**
- 2155**
- 2160**
- 2165**
- 2170**
- 2175**
- 2180**
- 2185**
- 2190**
- 2195**
- 2200**
- 2205**
- 2210**
- 2215**
- 2220**
- 2225**
- 2230**
- 2235**
- 2240**
- 2245**
- 2250**
- 2255**
- 2260**
- 2265**
- 2270**
- 2275**
- 2280**
- 2285**
- 2290**
- 2295**
- 2300**
- 2305**
- 2310**
- 2315**
- 2320**
- 2325**
- 2330**
- 2335**
- 2340**
- 2345**
- 2350**
- 2355**
- 2360**
- 2365**
- 2370**
- 2375**
- 2380**
- 2385**
- 2390**
- 2395**
- 2400**
- 2405**
- 2410**
- 2415**
- 2420**
- 2425**
- 2430**
- 2435**
- 2440**
- 2445**
- 2450**
- 2455**
- 2460**
- 2465**
- 2470**
- 2475**
- 2480**
- 2485**
- 2490**
- 2495**
- 2500**
- 2505**
- 2510**
- 2515**
- 2520**
- 2525**
- 2530**
- 2535**
- 2540**
- 2545**
- 2550**
- 2555**
- 2560**
- 2565**
- 2570**
- 2575**
- 2580**
- 2585**
- 2590**
- 2595**
- 2600**
- 2605**
- 2610**
- 2615**
- 2620**
- 2625**
- 2630**
- 2635**
- 2640**
- 2645**
- 2650**
- 2655**
- 2660**
- 2665**
- 2670**
- 2675**
- 2680**
- 2685**
- 2690**
- 2695**
- 2700**
- 2705**
- 2710**
- 2715**
- 2720**
- 2725**
- 2730**
- 2735**
- 2740**
- 2745**
- 2750**
- 2755**
- 2760**
- 2765**
- 2770**
- 2775**
- 2780**
- 2785**
- 2790**
- 2795**
- 2800**
- 2805**
- 2810**
- 2815**
- 2820**
- 2825**
- 2830**
- 2835**
- 2840**
- 2845**
- 2850**
- 2855**
- 2860**
- 2865**
- 2870**
- 2875**
- 2880**
- 2885**
- 2890**
- 2895**
- 2900**
- 2905**
- 2910**
- 2915**
- 2920**
- 2925**
- 2930**
- 2935**
- 2940**
- 2945**
- 2950**
- 2955**
- 2960**
- 2965**
- 2970**
- 2975**
- 2980**
- 2985**
- 2990**
- 2995**
- 3000**
- 3005**
- 3010**
- 3015**
- 3020**
- 3025**
- 3030**
- 3035**
- 3040**
- 3045**
- 3050**
- 3055**
- 3060**
- 3065**
- 3070**
- 3075**
- 3080**
- 3085**
- 3090**
- 3095**
- 3100**
- 3105**
- 3110**
- 3115**
- 3120**
- 3125**
- 3130**
- 3135**
- 3140**
- 3145**
- 3150**
- 3155**
- 3160**
- 3165**
- 3170**
- 3175**
- 3180**
- 3185**
- 3190**
- 3195**
- 3200**
- 3205**
- 3210**
- 3215**
- 3220**
- 3225**
- 3230**
- 3235**
- 3240**
- 3245**
- 3250**
- 3255**
- 3260**
- 3265**
- 3270**
- 3275**
- 3280**
- 3285**
- 3290**
- 3295**
- 3300**
- 3305**
- 3310**
- 3315**
- 3320**
- 3325**
- 3330**
- 3335**
- 3340**
- 3345**
- 3350**
- 3355**
- 3360**
- 3365**
- 3370**
- 3375**
- 3380**
- 3385**
- 3390**
- 3395**
- 3400**
- 3405**
- 3410**
- 3415**
- 3420**
- 3425**
- 3430**
- 3435**
- 3440**
- 3445**
- 3450**
- 3455**
- 3460**
- 3465**
- 3470**
- 3475**
- 3480**
- 3485**
- 3490**
- 3495**
- 3500**
- 3505**
- 3510**
- 3515**
- 3520**
- 3525**
- 3530**
- 3535**
- 3540**
- 3545**
- 3550**
- 3555**
- 3560**
- 3565**
- 3570**
- 3575**
- 3580**
- 3585**
- 3590**
- 3595**
- 3600**
- 3605**
- 3610**
- 3615**
- 3620**
- 3625**
- 3630**
- 3635**
- 3640**
- 3645**
- 3650**
- 3655**
- 3660**
- 3665**
- 3670**
- 3675**
- 3680**
- 3685**
- 3690**
- 3695</**

puede administrar solo o como componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión se pueden formular para su administración de cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

- 5 En ciertos casos, el procedimiento terapéutico de la divulgación incluye administrar la composición de forma sistémica o local como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta divulgación está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de ActRIIb que también se pueden incluir opcionalmente en la composición como se describió anteriormente, se pueden administrar simultánea o secuencialmente con los compuestos en cuestión (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb) en los procedimientos de la divulgación.
- 10

Normalmente, los antagonistas de ActRIIb se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más polipéptidos de ActRIIb en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que se pueden reconstituir en las soluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del recipiente pretendido o agentes de suspensión o espesamiento. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por medio del uso de surfactantes.

20 25 Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para su administración a un sitio de tejido diana (por ejemplo, la médula ósea). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, la médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y ópticamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos de ActRIIb. Dichas matrices se pueden formar por materiales que se utilizan actualmente para otras aplicaciones médicas implantadas.

30 35 La elección del material de la matriz es en base a la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirá la formulación apropiada. 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, tal como el colágeno óseo o dérmico. Otras matrices están compuestas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables y están químicamente definidas, como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas se pueden alterar en composición, tal como en aluminato-fosfato de calcio y procesamiento para alterar el tamaño de los poros, el tamaño de las partículas, la forma de las partículas y la biodegradabilidad.

40 45 En algunos casos, los procedimientos de la divulgación se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, píldoras, pastillas, tabletas, grageas (con el uso de una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (con el uso de una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, donde cada uno contiene una cantidad predeterminada de un agente como un ingrediente activo. Un agente también se puede administrar además como un bolo, electuario o pasta.

50 55 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención se pueden mezclar con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerina; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como los compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerina; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de estos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, agentes tampones. 60 65 Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina llenas

blandas y duras con el uso de excipientes tales como lactosa o azúcares de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

5 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elíxires farmacéuticamente aceptables. En adición a los ingredientes activos, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes que se usan comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, los aceites de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ácidos grasos de ésteres de sorbitán y mezclas de estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir además adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorante, saborizante, colorante, perfumantes y agentes conservantes.

10 15 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, tales como, alcoholes de isostearilo etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de estos.

20 25 Las composiciones de la invención pueden contener además adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabén, clorobutanol, ácido fenol 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 efectuar por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

30 35 Se entiende que el régimen de dosificación se determinará por el médico tratante considerando varios factores que modifican la acción de los compuestos en cuestión de la invención (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIb). Los diversos factores incluyen, pero no están limitados a, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones de diagnóstico, el recuento de glóbulos rojos deseado, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pudiera contribuir a un nivel bajo de glóbulos rojos, tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosis. El progreso se puede controlar mediante la evaluación periódica de los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina, así como evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

40 45 La presente divulgación también proporciona terapia génica para la producción in vivo de polipéptidos de ActRIIb. Tal terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de ActRIIb en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La administración de secuencias de polinucleótidos de ActRIIb se puede lograr con el uso de un vector de expresión recombinante tal como un virus químérico o un sistema de dispersión coloidal. Para el suministro terapéutico de secuencias de polinucleótidos de ActRIIb, se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

50 55 Varios vectores virales que se pueden utilizar para terapia génica como se enseñó en la presente memoria incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o un virus de ARN como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, pero no están limitados 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 adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador de selección de modo que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de la diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferente se logra utilizando un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden insertar secuencias polinucleotídicas específicas en el genoma retroviral o unirlas a una envoltura viral para permitir la administración específica de la diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido de ActRIIb.

60 Alternativamente, las células de cultivo de tejidos se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. A continuación, estas células se transfectan con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

65 Otro sistema de administración dirigido para polinucleótidos de ActRIIb es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferente de la presente invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como portadores de administración in vitro e in vivo. El ARN, el ADN y los viriones intactos se

5 pueden encapsular dentro del interior acuoso y administrar a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley y otros, Trends Biochem. Sci., 6: 77, 1981). Se conocen en la técnica procedimientos para la transferencia de genes eficiente con el uso de un portador liposómico, véase, por ejemplo, Mannino y otros, Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

10 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 direccionamiento de liposomas también es posible en base a, por ejemplo, la especificidad de órgano, especificidad de célula y especificidad de orgánulo y es conocido en la técnica.

15 Ejemplos

15 La invención que ahora se describe en general, se comprenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen de manera sencilla para propósitos de ilustración de algunas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no están destinados a limitar la invención.

20 Ejemplo 1. Generación de proteínas de fusión ActRIIb-Fc

25 Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActRIIb soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIb humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo (tres aminoácidos de glicina) en el medio. Las construcciones se denominan ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc, respectivamente.

25 ActRIIb-hFc se muestra a continuación como purificado de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 8):

30 GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTI
 ELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG
 GPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 35 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40 Las proteínas ActRIIb-hFc y ActRIIb-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

- (i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 11)
- 45 (ii) Activador de plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 12)
- (iii) Nativo: MGAAAKLAFAVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 13).

50 La forma seleccionada emplea el líder TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar (SEQ ID NO: 9):

50 MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELRTNQS
 GLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATE
 ENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVE
 VHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 60 QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

65 Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 10):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
 GTCTCGTT CGCCCGGCAC CTCTGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCCACC AACCAGAGCG

5 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
 GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
 10 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
 ACCCCCCGACA GCCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCCAAAA
 CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
 15 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGBA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGGGGA GGAGCAGTAC
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG
 20 TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCA AGAACCCAGGT
 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATGCCGTGG
 25 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACAA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGG
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 AAATGA

30 La secuenciación N-terminal del material producido en células CHO reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 22). En particular, otros constructos informados en la literatura comienzan con una secuencia -SGR...

35 La purificación se puede lograr mediante una serie de pasos 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 se podría completar con filtración viral e intercambio de tampón.

40 Las proteínas de fusión ActRIIb-Fc también se expresaron en células HEK293 y células COS. Aunque el material de todas las líneas celulares y las condiciones de cultivo razonables proporcionó proteína con actividad de construcción muscular in vivo, se observó variabilidad en la potencia relacionada quizás con la selección de la línea celular y/o las condiciones de cultivo.

45 Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes como proteínas de fusión solubles entre ActRIIB extracelular y un dominio Fc. La fusión de fondo ActRIIB-Fc tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6. Se introdujeron varias mutaciones, que incluye los truncamientos N- y C-terminales, en la proteína ActRIIB-Fc de fondo. En base a los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que estas construcciones, si se expresan con un líder de TPA, carezcan de la serina N-terminal. Las mutaciones se generaron en el dominio extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Despues de la PCR, los fragmentos se purificaron a través de una columna Qiagen, se dirigieron con Sfol y Agel y se purificaron en gel. Estos fragmentos se ligaron en el vector de expresión pAID4 (véase WO2006/012627) de manera que tras la ligadura creó una quimera de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en E. coli DH5 alfa, se recogieron las colonias y se aislaron los ADN. Para las construcciones murinas (mFc), una IgG2a murina se sustituyó por la IgG1 humana. Se verificó la secuencia de todos los mutantes.

55 Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección transitoria. En resumen, en una centrífuga de 500 ml, las células HEK293T se configuraron a 6×10^5 células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en un volumen de 250 ml y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, estas células se trataron con complejo de ADN: PEI (1:1) a una concentración final de ADN de 0,5 ug/ml. Despues de 4 horas, se agregaron 250 ml de medio y las células se cultivaron durante 7 días. El medio acondicionado se recogió centrifugando las células y se concentró.

60 Los mutantes se purificaron con el uso de una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, columna de proteína A y se eluyeron con tampón de glicina de pH bajo (3,0). Despues de la neutralización, estos se dializaron contra PBS.

También se produjeron mutantes en células CHO mediante una metodología similar.

Los mutantes se probaron en ensayos de unión y/o bioensayos descritos. Las características de varias variantes de ActRIIb se describen en WO/2008/097541 y WO/2006/012627. En algunos casos, los ensayos se realizaron con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas. Las variaciones adicionales de ActRIIb se describen en Solicitud de EE. UU. No. de serie 12/012,652.

5 Ejemplo 2. ActRIIb-hFc estimula la eritropoyesis en primates no humanos

Se administró ActRIIb-hFc (IgG1) una vez a la semana durante 1 mes a monos cynomolgus machos y hembras mediante inyección subcutánea. Se asignaron cuarenta y ocho monos cynomolgus (24/sexo) a uno de los cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se les administraron inyecciones subcutáneas tanto del vehículo como de 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 provocó valores de reticulocitos absolutos medios elevados estadísticamente significativos el día 15 en los animales tratados. Para el día 36, ActRIIb-hFc provocó varios cambios hematológicos, que incluye los valores de ancho de distribución de glóbulos rojos y reticulocitos absolutos medios elevados y una concentración de hemoglobina corpuscular media más baja. Todos los grupos tratados y ambos sexos se vieron afectados. Estos efectos son consistentes con un efecto positivo de ActRIIb-hFc sobre la liberación de reticulocitos inmaduros de la médula ósea. Este efecto se revirtió después de que se eliminó el fármaco de los animales tratados (en el día 56 del estudio). En consecuencia, llegamos a la conclusión de que ActRIIb-hFc estimula la eritropoyesis.

20 Ejemplo 3. ActRIIb-mFc promueve aspectos de la eritropoyesis en ratones mediante la estimulación de las actividades eritropoyéticas esplénicas

En este estudio se analizaron los efectos de la administración in vivo de ActRIIb-mFc sobre la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea y el bazo. A un grupo de ratones Black6 se le inyectó PBS como control y a un segundo grupo de ratones se les administraron dos dosis de ActRIIb-mFc a 10 mg/kg y ambos grupos se sacrificaron después de 8 días. Se utilizó sangre periférica para realizar hemogramas completos y se utilizaron fémures y bazos para realizar ensayos clonogénicos in vitro para evaluar el contenido de células progenitoras linfoideas, 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 los grupos de control y tratados. En los bazos, el grupo tratado con el compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo en el número de colonias progenitoras eritroides maduras (CFU-E) por placa, frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (CFU-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y número total de progenitores por bazo.

Excepto por la cepa de ratón utilizada, la metodología detallada en este estudio fue la misma que la descrita anteriormente en el Ejemplo 6. Los valores medios (+/- DE) para cada grupo se muestran en las tablas siguientes.

40 Tabla: Parámetros hematológicos

Grupo de Tratamiento	Glóbulos blancos ($\times 10^9/L$)	Glóbulos rojos ($\times 10^9/L$)	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

50 Tabla: UFC de fémur y bazo

Grupo de Tratamiento	UFC total por fémur	UFC total por bazo	UFC-E total por fémur	UFC-E total por bazo
PBS (n = 8)	88 +/- 10	54 +/- 14	156 +/- 27	131 +/- 71
ActRIIb-mFc (n = 8)	85 +/- 9	79 +/- 6*	164 +/- 23	436 +/- 86*

* el análisis preliminar indica p < 0,05

55 El tratamiento de ratones con ActRIIb-mFc, en el breve período de tiempo de este estudio, no produjo aumentos significativos en el contenido de glóbulos rojos o hemoglobina. En los fémures no hubo diferencia en el número de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratados. En los bazos, el grupo tratado con el 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 progenitoras eritroides maduras (UFC-E) por placa, frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y número total de progenitores por bazo. Por consiguiente, se espera que durante un período de tiempo más largo, el tratamiento con ActRIIb-mFc pueda dar como resultado un contenido elevado de glóbulos rojos y hemoglobina.

65 Ejemplo 4: Efectos de ActRIIb-Fc en varias especies en estudios a largo plazo

ActRIIb-Fc tiene un efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros hematológicos en roedores. En un estudio multidosis de 3 meses de ActRIIb-hFc en ratas, se observaron aumentos significativos en la concentración de hemoglobina o en el recuento de glóbulos rojos y las concentraciones de reticulocitos aumentaron de manera dependiente de la dosis.

		Tabla: Parámetros hematológicos en un estudio de 3 meses en ratas Sprague-Dawley				
		Sexo (n)				
		Machos (10/grupo)				
		Dosis (mg/kg)	Vehículo	3	10	60
10		Glóbulos rojos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,6	9,9 *	10,2 *	9,1 *
		Hemoglobina (g/dl)	15,9	17,4 *	17,9 *	16,4
		Reticulocitos ($\times 10^9/\text{L}$)	176	250 *	272 *	446 *
		Sexo (n)				
		Hembras (10/grupo)				
		Dosis (mg/kg)	Vehículo	3	10	30
15		Glóbulos rojos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,2	8,7	9,3 *	9,7 *
		Hemoglobina (g/dl)	15,7	16,2	16,5	17,5
		Reticulocitos ($\times 10^9/\text{L}$)	169	200	239	332 *
* Estadísticamente significativo frente al vehículo ($P \leq 0,05$)						

Curiosamente, en un estudio multidosis de 3 meses de ActRIIB-hFc en monos cynomolgus no hubo aumentos significativos en los niveles de hematocrito, niveles de hemoglobina o recuento de glóbulos rojos, y las concentraciones de reticulocitos aumentaron modestamente durante el transcurso del estudio. En un ensayo de fase de la ActRIIB-hFc, hubo aumentos en los parámetros hematológicos en algunas dosis, con aumentos típicamente observados en los niveles de dosis más altos dentro de los días de la primera dosis y al finalizar el estudio. Estos datos indican que las proteínas de fusión ActRIIB-Fc se pueden usar para aumentar los parámetros hematológicos en humanos.

Ejemplo 5: ActRIIb-mFc aumenta la masa muscular en ratones

Como se describe en Patente de EE.UU. de Solicitud 12/012,652, ActRIIb-mFc es eficaz para promover el crecimiento de la masa muscular en una variedad de modelos de ratón de trastornos musculares humanos, que incluyen distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica y caquexia por cáncer. Como ejemplo, aquí se presenta un conjunto de estos datos.

Los solicitantes probaron la capacidad de ActRIIB (R64 20-134)-mFc para atenuar la pérdida de músculo en un modelo de ratón de atrofia muscular inducida por glucocorticoides.

A los ratones se les administró por vía subcutánea diariamente durante 13 días PBS o dexametasona (2 mg/kg) para inducir la atrofia muscular. Durante los mismos 13 días, los grupos tratados con PBS y dexametasona recibieron vehículo o ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg; ip; dos veces/semana) de modo que se representaron todas las combinaciones de tratamientos. Los ratones se escanearon por RMN en los días 0 y 13 para determinar los cambios en la masa de tejido magro entre los grupos. Los resultados de RMN se exponen en la Tabla 6, más abajo.

Tabla 6: Masa de tejido magro de ratones tratados con vehículo y ActRIIB murino (R64 20-134) -Fc

Grupo (sc: tratamiento ip)	Promedio día magro 13-Promedio día magro 0 (g) ± desviación estándar
PBS: PBS	0,83 ± 0,94
Dexametasona: PBS	0,47 ± 0,34 ^a
Dexametasona: ActRIIB	2,56 ± 0,37 ^{a,b}
PBS: ActRIIB	3,63 ± 0,62 ^a

^a Diferencia significativa en comparación con PBS: PBS en $p < 0,05$

^b Diferencia significativa en comparación con Dexametasona: PBS en $p < 0,05$

La exploración por RMN mostró una disminución significativa del 2,5 % en la masa de tejido magro en el grupo dexametasona: PBS en comparación con la cohorte PBS: PBS. Por el contrario, el grupo dexametasona: ActRIIB (R64 20-134)-mFc mostró un aumento del 13,5 % en la masa de tejido magro, un aumento significativo en comparación con los grupos PBS: PBS y dexametasona: PBS. La caquexia es un efecto secundario indeseable para una variedad de tratamientos terapéuticos, que incluye la terapia crónica con glucocorticoides. Por lo tanto, podría ser de importancia clínica que el tratamiento con una proteína ActRIIB (R64 20-134)-mFc humana pueda atenuar el desgaste muscular asociado con la caquexia.

Mientras que las realizaciones específicas de la materia en cuestión se han discutido, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones resultarán evidentes a aquellos con experiencia en la técnica con la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones más abajo. El ámbito completo de la invención será determinado con referencia a las reivindicaciones, junto con su ámbito completo de los equivalentes, y la memoria descriptiva, junto con dichas variaciones.

5 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición para su uso en el aumento de los niveles de glóbulos rojos y el aumento de la formación de músculo en un paciente con anemia que lo necesita, en el que (i) el paciente tiene caquexia o sarcopenia, (ii) la composición comprende una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIb y (iii) el antagonista es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina y un polipéptido de ActRIIb, el polipéptido de ActRIIb se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la SEQ ID NO: 1;
 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la SEQ ID NO: 2; y
 c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la SEQ ID NO: 3

15 2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista de ActRIIb comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95 % a la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6; la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

20 3. La composición para su uso de la reivindicación 2, en el que el antagonista de ActRIIb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6; la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

25 4. La composición para su uso de cualquier reivindicación anterior, en el que dicho antagonista de ActRIIb incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.

30 5. La composición para su uso de la reivindicación 4, en el que el antagonista de ActRIIb-Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

35 6. La composición para su uso de cualquier reivindicación anterior, en el que el paciente tiene caquexia.

40 7. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene sarcopenia.

45

50

55

60

65

ActRIIa ILGRSETQEC LFE_nNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IY_nNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKOGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKF SYFPEM
IELVKKG_nCWL DDFN_nCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNSPV TPKPPT
GGPEVTVYEPP PTAPT

Figura 1