

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 470**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2017** **PCT/US2017/043967**
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018** **WO18022762**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2017** **E 17835212 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 3490582**

54 Título: **Composiciones para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis**

30 Prioridad:

27.07.2016 US 201662367289 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KUMAR, RAVINDRA y
VENKATA SAI RAJASEKHAR SURAGANI, NAGA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 984 470 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos con número de serie 62/367 289, presentada el 27 de julio de 2016.

Antecedentes de la invención

- 10 La mielofibrosis es una enfermedad de baja incidencia que afecta principalmente a personas de edad avanzada. La mielofibrosis es una neoplasia mieloproliferativa negativa a BCR-ABL1 que se presenta *de novo* (primaria) o puede ir precedida de policitemia vera (posterior a policitemia vera) o trombocitemia esencial (posterior a trombocitemia esencial). Las características clínicas incluyen anemia progresiva, esplenomegalia marcada, fibrosis (por ejemplo, fibrosis de la médula ósea), síntomas generales (por ejemplo, fatiga, sudores nocturnos, dolor óseo, prurito y tos) y pérdida de peso [Tefferi A. (2000), N. Engl. J. Med., 342:1255-1265]. La mediana de supervivencia oscila entre menos de 2 años y más de 15 años en función de los factores pronósticos identificados en la actualidad. En pacientes con mielofibrosis se han descrito mutaciones que afectan a JAK2, MPL, TET2, ASXL1, IDH1/IDH2, CBL, IKZF1, LNK y EZH2 [James C. *et al.* (2005), Nature 434:1144-1148, 2005; Scott L. M. *et al.* (2007), N. Engl. J. Med., 356:459-468, 2007; Pikman Y. *et al.* (2006), PLoS Med., 3:e270; Delhommeau F. *et al.* (2009), N. Engl. J. Med., 360:2289-2301; Carubbia N. *et al.* (2009), Leukemia, 23:2183-2186; Green A. *et al.* (2010), N. Engl. J. Med., 362:369-370; Tefferi A. *et al.* (2010), Leukemia, 24:1302-1309; Grand F. H. *et al.* (2009), Blood, 113:6182-6192; Jager R. *et al.* (2010), Leukemia, 24:1290-1298; Oh S. T. *et al.* (2010), Blood, 116:988-992; y Ernst T. *et al.*, Nat. Genet., 42:722-726].
- 20 Algunas mutaciones se producen con alta frecuencia en la mielofibrosis (por ejemplo, las mutaciones de JAK2 en aproximadamente el 50 % de los pacientes), y bien directamente (por ejemplo, las mutaciones de JAK2 o MPL) o indirectamente (por ejemplo, las mutaciones de LNK o CBL) inducen la hiperactivación de JAK-STAT.

- 25 La única cura de la mielofibrosis es el trasplante de médula ósea. Sin embargo, la mortalidad relacionada con el tratamiento es elevada, y sólo una minoría de pacientes cumple los requisitos para recibir un trasplante. Muchos de los demás tratamientos disponibles en la actualidad no son eficaces para revertir el proceso de la mielofibrosis, ya se trate de una enfermedad primaria o secundaria. Los tratamientos de la mielofibrosis incluyen, por ejemplo, terapia citorreductora (por ejemplo, tratamiento con hidroxiurea); tratamiento de la anemia con andrógenos y/o eritropoyetina; y esplenectomía. Estas terapias no han demostrado una mejora en la supervivencia y se consideran en gran medida paliativas [Cervantes F., Myelofibrosis: Biology and treatment options, European Journal of Haematology, 2007, 79 (supl. 68), 13-17]. Más recientemente, se han utilizado inhibidores de JAK para tratar la mielofibrosis. Los inhibidores de JAK parecen ser útiles para reducir la esplenomegalia en pacientes con mielofibrosis, pero sus efectos sobre la enfermedad son en gran medida paliativos [Gupta *et al.* (2012), Blood, 120: 1367-1379]. En concreto, los inhibidores de JAK tienen un efecto escaso o nulo sobre muchas manifestaciones (complicaciones) de la enfermedad, entre las que se incluyen, por ejemplo, la citopenia, la dependencia de transfusiones, la enfermedad en fase acelerada o blástica y la fibrosis. Un estudio de fase Ib/II del inhibidor de JAK ruxolitinib (RUX) junto con el fármaco inmunomodulador pomalidomida (POM) para el tratamiento de la mielofibrosis ha sido notificado por Stengelmann F. *et al.*, base de datos Biosis, n.º de registro de la base de datos PREV201600270701, Biosciences Information Service, Filadelfia, PA, EE. UU.; 3 de diciembre de 2015. Además, se ha demostrado que los inhibidores de JAK inducen, o empeoran, la trombocitopenia, la anemia y la neutropenia en algunos pacientes.
- 40 Por lo tanto, existe una gran necesidad insatisfecha de terapias eficaces para tratar la mielofibrosis. En consecuencia, es un objetivo de la presente divulgación proporcionar procedimientos para tratar o prevenir la mielofibrosis, en concreto tratar o prevenir una o más complicaciones de la mielofibrosis.

Sumario de la invención

- 45 La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Toda realización no comprendida en el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada. Cualquier referencia en la presente descripción a procedimientos de tratamiento o prevención se refiere a los compuestos, las composiciones (farmacéuticas) y los medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 50 En consecuencia, la presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento, la prevención o la reducción de la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis en un paciente, en la que la composición comprende: a) un inhibidor de la cinasa Janus; y b) un antagonista de ActRIIB, en la que el inhibidor de la cinasa Janus y el antagonista de ActRIIB se administran en una cantidad eficaz, en la que el inhibidor de la cinasa Janus se selecciona del grupo que consiste en: ruxolitinib, fedratinib (SAR302503), monolotinib (CYT387), pacritinib, lestaurtinib, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 y AT-9283, y en el que el antagonista de ActRIIB es un polipéptido de ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 % a una secuencia que comienza en un residuo correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 de SEQ ID NO: 1 y que termina en un residuo correspondiente

a uno cualquiera de los aminoácidos 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134 de SEQ ID NO: 1; y en la que el polipéptido de ActRIIB comprende un aminoácido ácido en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1, y en la que el polipéptido de ActRIIB inhibe GDF11 sin inhibir la activina A.

- 5 En una realización preferida, la composición disminuye una o más de las siguientes: fibrosis de la médula ósea, fibrosis del bazo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar y fibrosis de los ganglios linfáticos. En otra realización preferida, la composición aumenta los niveles de glóbulos rojos en el paciente y/o aumenta los niveles de hemoglobina en el paciente.

En otra realización más preferida, el paciente padece anemia y la composición trata la anemia.

- 10 En otras realizaciones o en realizaciones aún más preferidas, al paciente se le han administrado una o más transfusiones de células sanguíneas antes del inicio del tratamiento con el polipéptido de ActRIIB y/o el paciente es dependiente de transfusiones de células sanguíneas; y la composición de uso disminuye la carga de transfusiones de células sanguíneas en más de aproximadamente un 30 % durante 4 a 8 semanas en relación con el mismo tiempo antes del inicio del tratamiento con el polipéptido de ActRIIB.

- 15 En otras realizaciones o en realizaciones aún más preferidas, el paciente padece mielofibrosis primaria, mielofibrosis posterior a policitemia vera y/o mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial.

En otra realización preferida, la mielofibrosis está asociada con una o más mutaciones en JAK2.

En las realizaciones preferidas de esta última realización, la mutación de JAK2 es JAK2V617F.

- 20 En otras realizaciones o en realizaciones aún más preferidas, el paciente ha sido tratado con un inhibidor de la cinasa Janus y/o es intolerante a un inhibidor de la cinasa Janus.

En realizaciones preferidas, al paciente se le administra además hidroxiurea, ha sido tratado previamente con hidroxiurea, es intolerante a la hidroxiurea y/o tiene una respuesta inadecuada a la hidroxiurea.

En realizaciones preferidas, el polipéptido de ActRIIB se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1;

b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1;

- 30 c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

- 35 d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

- 40 f) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

g) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

- 45 h) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y

- 50 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

En otras realizaciones preferidas, el polipéptido comprende un residuo de aspartato (D) en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.

En realizaciones preferidas alternativas, el polipéptido comprende un residuo de glutamato (E) en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.

5 En otras realizaciones o en realizaciones aún más preferidas, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina, en el que el dominio Fc de inmunoglobulina es de un dominio Fc de IgG1, y en el que la proteína de fusión comprende además un dominio conector situado entre el polipéptido de ActRIIB y el dominio Fc de inmunoglobulina.

10 En realizaciones preferidas de la última realización, el polipéptido es una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que comprende un polipéptido seleccionado de:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;

15 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;

20 d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;

25 e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

f) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

30 g) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;

h) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y

35 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

En otras realizaciones o en realizaciones aún más preferidas, el polipéptido de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 53.

40 En realizaciones aún más preferidas, el polipéptido de ActRIIB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

En parte, la presente divulgación se refiere al descubrimiento de que un antagonista (inhibidor) de ActRIIB puede usarse para tratar la mielofibrosis, especialmente mejora diversas complicaciones de la enfermedad incluidas, por ejemplo, la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis. En concreto, los datos presentados en el presente documento demuestran que un polipéptido trampa de GDF disminuye la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis en un modelo *JAK2V617F* de mielofibrosis. En consecuencia, la divulgación se refiere en general a composiciones para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis, en concreto el tratamiento o la prevención de una o más complicaciones de la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis), mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de ActRIIB, opcionalmente junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos para el tratamiento de la mielofibrosis.

Aunque los polipéptidos trampa de GDF pueden afectar a la mielofibrosis a través de un mecanismo distinto del antagonismo a ActRIIB [por ejemplo, la inhibición de uno o más de GDF11, GDF8, activina B, BMP6, GDF3 y BMP 10 puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de agentes adicionales, incluidos, quizás, otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y dicha inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado, por ejemplo, sobre la mielofibrosis], la divulgación demuestra, no obstante, que los agentes terapéuticos deseables pueden seleccionarse basándose en el antagonismo a ActRIIB. Por lo tanto, aunque no se desea quedar restringido a un mecanismo de acción concreto, se espera que otros antagonistas de ActRIIB [por ejemplo, antagonistas del receptor de ActRIIB, antagonistas de uno o más ligandos de ActRIIB (por ejemplo, GDF11, GDF8, activina B, BMP6, GDF3 y BMP10), antagonistas de uno o más receptores de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), antagonistas de uno o más correceptores y/o antagonistas de uno o más componentes de la transducción de señales posteriores a ActRIIB (por ejemplo, Smads)], o una combinación de tales antagonistas] serán útiles en el tratamiento de la mielofibrosis, en especial en el tratamiento o la prevención de una o más complicaciones de la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis). Dichos agentes se denominan colectivamente en el presente documento "antagonistas de ActRIIB" o "inhibidores de ActRIIB".

En consecuencia, en el presente documento se divulgan, pero no están comprendidos en las reivindicaciones, procedimientos para tratar la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar una o más complicaciones de la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos de prevención de la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. En el presente documento también se describen, pero no están cubiertos por las reivindicaciones, procedimientos para prevenir una o más complicaciones de la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. En determinados aspectos no reivindicados, la divulgación se refiere a reducir la tasa de progresión de la mielofibrosis, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. En algunas realizaciones no reivindicadas, la divulgación se refiere a reducir la tasa de progresión de una o más complicaciones de la mielofibrosis, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para reducir la gravedad de la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. En algunas realizaciones no reivindicadas, la divulgación se refiere a procedimientos para reducir la gravedad de una o más complicaciones de la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece mielofibrosis primaria. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece mielofibrosis posterior a policitemia vera. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o de una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de bajo riesgo según el Sistema Internacional de Puntuación Pronóstica (International Prognostic Scoring System, IPSS). También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de riesgo intermedio-1 según el IPSS. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de riesgo intermedio-2 según el IPSS. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de alto riesgo según el IPSS. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de bajo riesgo según el IPSS dinámico (DIPSS). También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de riesgo intermedio-1 según el DIPSS. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de alto riesgo según el DIPSS. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de bajo riesgo según el DIPSS-plus. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de riesgo intermedio-1 según el DIPSS-plus. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más

complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece una mielofibrosis de riesgo intermedio-2 según el DIPSS-plus. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente padece mielofibrosis de alto riesgo según el DIPSS-plus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis de acuerdo con cualquiera de los modelos reconocidos de estratificación del riesgo de mielofibrosis (por ejemplo, IPSS, DIPPS y DIPPS-plus). Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis desde un riesgo bajo a un riesgo intermedio-1 según IPSS, DIPPS o DIPPS-plus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis desde un riesgo intermedio-1 a un riesgo intermedio-2 según IPSS, DIPPS o DIPPS-plus. Se puede utilizar un antagonista de ActRIIB para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis desde un riesgo intermedio-2 a un riesgo alto según IPSS, DIPPS o DIPPS-plus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis de acuerdo con cualquiera de los modelos reconocidos de estratificación del riesgo de mielofibrosis (por ejemplo, IPSS, DIPPS y DIPPS-plus). Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis desde un alto riesgo a un riesgo intermedio-2 según IPSS, DIPPS o DIPPS-plus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis desde un riesgo intermedio-2 a un riesgo intermedio-1 según IPSS, DIPPS o DIPPS-plus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis desde un riesgo intermedio-1 a un riesgo bajo según IPSS, DIPPS o DIPPS-plus. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos de uso de antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente presenta una o más mutaciones genéticas asociadas con la mielofibrosis. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede usarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en la que la mielofibrosis está asociada con una o más mutaciones genéticas seleccionadas del grupo que consiste en: nulicigosidad para el haplotipo JAK2 46/1, JAK2V617F, IDH1, IDH2, EZH2, SRSF2, ASXL1, JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, MPL, CALR, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, TET2, THPO y LNK. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en la que la mielofibrosis está asociada con una o más mutaciones genéticas en una cinasa Janus (JAK) (por ejemplo, JAK1, JAK2 y/o JAK3). Un antagonista de ActRIIB puede usarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en la que la mielofibrosis está asociada con una o más mutaciones genéticas en JAK2. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en la que la mielofibrosis está asociada a una mutación JAK2V617F. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos de uso de un antagonista de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que la mielofibrosis se asocia con uno o más marcadores séricos elevados seleccionados del grupo que consiste en: aumento de los niveles séricos de IL-8, aumento de los niveles séricos de IL-2R y aumento de los niveles séricos de cadenas ligeras libres. También se describen, pero no se reivindican, procedimientos de uso de un antagonista de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente ha sido tratado con un inhibidor de la cinasa Janus (por ejemplo, ruxolitinib, fedratinib (SAR302503), monoelotinib (CYT387), pacritinib, lestaurtinib, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 y AT-9283). Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en el que el paciente es intolerante a un inhibidor de la cinasa Janus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o de una o más complicaciones de la mielofibrosis, en el que el paciente presenta una respuesta inadecuada a un inhibidor de la cinasa Janus. También se describen, pero no se reivindican, procedimientos de uso de un antagonista de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en los que el paciente ha sido tratado con hidroxiurea. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en el que el paciente es intolerante a la hidroxiurea. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, en el que el paciente presenta una respuesta inadecuada a la hidroxiurea.

Como se describe en el presente documento, la mielofibrosis es un trastorno neoplásico clonal de la hematopoyesis que se asocia con diversas complicaciones clínicas que pueden manifestarse durante la progresión de la enfermedad en un paciente. Los ejemplos de la divulgación demuestran que un antagonista de ActRIIB puede usarse para mitigar varias de estas complicaciones clínicas, lo que indica que un antagonista de ActRIIB puede usarse para tratar más ampliamente diversas complicaciones de la mielofibrosis en contraposición a muchas de los tratamientos actuales de la mielofibrosis, que sólo tratan una complicación o un número limitado de complicaciones de la enfermedad. Por lo tanto, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la hematopoyesis ineficaz en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la hematopoyesis extramedular en un paciente con mielofibrosis. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la hematopoyesis extramedular en el bazo (hematopoyesis extramedular esplénica) en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de

progresión y/o la gravedad de la hematopoyesis extramedular en el hígado (hematopoyesis extramedular hepática) en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la hematopoyesis extramedular en el pulmón (hematopoyesis extramedular pulmonar) en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la hematopoyesis extramedular en los ganglios linfáticos (hematopoyesis extramedular linfática) en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la inflamación y/o el agrandamiento (tamaño) de un órgano o tejido en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la inflamación y/o el agrandamiento (tamaño) en el bazo de un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la inflamación y/o el agrandamiento (tamaño) en el hígado de un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la inflamación y/o el agrandamiento (tamaño) en el pulmón o pulmones de un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la inflamación y/o el agrandamiento (tamaño) en los ganglios linfáticos de un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la esplenomegalia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la hepatomegalia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la fibrosis en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la fibrosis de la médula ósea en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la fibrosis del bazo en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la fibrosis hepática en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la fibrosis pulmonar en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la fibrosis ganglionar en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la osteoesclerosis en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la osteomielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones de la mielofibrosis relacionadas con la sangre. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la anemia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la trombocitopenia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la pancitopenia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la poiquilocitosis en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de las hemorragias en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de uno o más síntomas generales de la mielofibrosis (por ejemplo, fatiga, prurito, pérdida de peso, sudores nocturnos, fiebre, dolor o molestias abdominales, parestesias y saciedad precoz). Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad del dolor en un tejido y/u órgano en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad del dolor óseo en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la artralgia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mialgia en un paciente con mielofibrosis. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la caquexia en un paciente con mielofibrosis. En determinados aspectos, la divulgación se refiere a aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente con mielofibrosis mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. En determinados aspectos, la divulgación se refiere a aumentar los niveles de hemoglobina en un paciente con mielofibrosis mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. En determinados aspectos, un paciente con mielofibrosis que va a ser tratado según los procedimientos descritos en el presente documento tiene anemia. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la anemia en un paciente con mielofibrosis. En determinados aspectos, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una complicación de la mielofibrosis en pacientes a los que se ha administrado una o más transfusiones de células sanguíneas (transfusiones de glóbulos rojos o sangre entera). En algunas realizaciones, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una complicación de la mielofibrosis en pacientes dependientes de transfusiones de células sanguíneas. En determinados aspectos, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para disminuir la carga de transfusión de células sanguíneas en un paciente con mielofibrosis. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para disminuir la transfusión de células sanguíneas en más de un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 100 % durante 4 a 8 semanas en relación con el mismo tiempo antes del inicio del tratamiento con el antagonista de ActRIIB. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para disminuir la transfusión de células sanguíneas en más de un 50 % durante 4 a 8 semanas en relación con el mismo tiempo antes del inicio del tratamiento con el antagonista de ActRIIB en un

paciente con mielofibrosis. Puede utilizarse un antagonista de ActRIIB para disminuir la sobrecarga de hierro en un paciente con mielofibrosis. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para disminuir la sobrecarga de hierro en un órgano o tejido en un paciente con mielofibrosis. Puede utilizarse un antagonista de ActRIIB para disminuir la sobrecarga de hierro en el bazo de un paciente con mielofibrosis. Puede utilizarse un antagonista de ActRIIB para disminuir la sobrecarga de hierro en el hígado de un paciente con mielofibrosis. Puede utilizarse un antagonista de ActRIIB para disminuir la sobrecarga de hierro en el corazón de un paciente con mielofibrosis.

A un paciente con mielofibrosis se le pueden administrar además uno o más agentes activos adicionales y/o tratamientos de apoyo (además de la administración de uno o más antagonistas de ActRIIB) para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis. Por ejemplo, a un paciente se le pueden administrar además uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos que se seleccionan del grupo que consiste en: transfusión de sangre (sangre entera o transfusión de glóbulos rojos), quelantes del hierro (por ejemplo, deferroxamina, deferiprona y deferasirox), corticoesteroides, prednisona, AEE (por ejemplo, eritropoyetina, epoetina alfa, epoetina beta, darbepoetina alfa y metoxipolietilenglicol-epoetina beta), andrógenos, danazol, talidomida, lenalidomida, un agente citorreductor, hidroxiurea, busulfán, melfalm, cladribina, esplenectomía, radioterapia, aspirina, pomalidonmida, inhibidores de la cinasa Janus, inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina, sirolimus, deforolimus, everolimus, temsirolimus, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055 y AZD2014) e inhibidores de la histona deacetilasa (por ejemplo, givinostat, panobinostat y pracinostat). También se describen en el presente documento, aunque no se encuentran dentro del alcance de la invención reivindicada, procedimientos para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite: a) un inhibidor de la cinasa Janus; y b) un antagonista de ActRIIB, en los que el inhibidor de la cinasa Janus y el antagonista de ActRIIB se administran en una cantidad eficaz. Puede administrarse un antagonista de ActRIIB antes del tratamiento con el inhibidor de la cinasa Janus. Puede administrarse un antagonista de ActRIIB tras el tratamiento con el inhibidor de la cinasa Janus. Puede administrarse un antagonista de ActRIIB simultáneamente con el inhibidor de la cinasa Janus. Los inhibidores de la cinasa Janus pueden ser un agente que inhiba una o más cinasas Janus seleccionadas del grupo que consiste en: JAK1, JAK2 y JAK3. Por ejemplo, un inhibidor de la cinasa Janus puede ser un agente que inhibe la transducción de señales de uno o más de JAK1, JAK2 y JAK3 en un ensayo en células. Un inhibidor de la cinasa Janus puede seleccionarse del grupo que consiste en: ruxolitinib, fedratinib (SAR302503), monoelotinib (CYT387), pacritinib, lestaurtinib, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 y AT-9283. Un inhibidor de la cinasa Janus puede ser ruxolitinib.

Los inhibidores de la cinasa Janus (por ejemplo, ruxolitinib) han sido aprobados para el tratamiento de una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, la mielofibrosis. Además, hay otras investigaciones clínicas en curso para determinar la eficacia de los inhibidores de la cinasa Janus en el tratamiento de otras enfermedades. Un efecto secundario adverso frecuente del tratamiento con inhibidores de la cinasa Janus es la anemia. Si bien la transfusión de células sanguíneas y el tratamiento con un activador del receptor de EPO pueden utilizarse para tratar la anemia en pacientes tratados con un inhibidor de la cinasa Janus, estos tratamientos contra la anemia también se asocian con efectos adversos en los pacientes (por ejemplo, favorecer o aumentar la sobrecarga de hierro, una respuesta inadecuada a la EPO e intolerancia a la EPO). Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de procedimientos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos/hemoglobina y tratar la anemia en pacientes tratados con un inhibidor de la cinasa Janus. En parte, la presente divulgación se refiere al descubrimiento de que un antagonista (inhibidor) de ActRIIB puede utilizarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes tratados con un inhibidor de la cinasa Janus. En consecuencia, también se describen, aunque no se reivindican, composiciones y procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos/hemoglobina y tratar o prevenir la anemia en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de ActRIIB, opcionalmente junto de uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos para tratar la anemia. Aunque los polipéptidos trampa de GDF pueden afectar a los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina a través de un mecanismo distinto del antagonismo a ActRIIB [por ejemplo, la inhibición de uno o más de GDF11, GDF8, activina B, BMP6, GDF3 y BMP10 puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de agentes adicionales, incluidos, quizás, otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y tal inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado, por ejemplo, sobre los niveles de glóbulos rojos y/o los niveles de hemoglobina en pacientes tratados con un inhibidor de la cinasa Janus], la divulgación demuestra no obstante que los agentes terapéuticos deseables pueden seleccionarse basándose en el antagonismo a ActRIIB. Por lo tanto, aunque no se desea quedar restringido a un mecanismo de acción concreto, se espera que otros antagonistas de ActRIIB [por ejemplo, antagonistas del receptor de ActRIIB, antagonistas de uno o más ligandos de ActRIIB (por ejemplo, GDF11, GDF8, activina B, BMP6, GDF3 y BMP10), antagonistas de uno o más receptores de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), antagonistas de uno o más correceptores y/o antagonistas de uno o más componentes de la transducción de señales posteriores a ActRIIB (por ejemplo, Smads)], o combinación de tales antagonistas] serán útiles en el tratamiento de pacientes tratados con una cinasa Janus, en concreto para tratar o prevenir una o más complicaciones asociadas con el tratamiento con la cinasa Janus (por ejemplo, anemia, trombocitopenia y/o neutropenia). Dichos agentes se denominan colectivamente en el presente documento "antagonistas de ActRIIB" o "inhibidores de ActRIIB".

También se describen en el presente documento, aunque no se reivindican como tales, procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o los niveles de hemoglobina en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus,

mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un antagonista de ActRIIB. Los antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse para tratar o prevenir la anemia en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. A un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus se le pueden haber administrado una o más transfusiones de células sanguíneas antes del inicio del tratamiento con el antagonista de ActRIIB. Un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus es dependiente de transfusiones de células sanguíneas. También se describen en el presente documento, aunque no se reivindican, procedimientos de uso de un antagonista de ActRIIB para disminuir la carga de transfusión de células sanguíneas en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para disminuir la transfusión de células sanguíneas en más de un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 100 % durante 4 a 8 semanas en relación con el mismo tiempo anterior al inicio del tratamiento con antagonistas de ActRIIB en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse para disminuir la transfusión de células sanguíneas en más de un 50 % aproximadamente durante 4 a 8 semanas en relación con el mismo tiempo anterior al inicio del tratamiento con antagonistas de ActRIIB en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos de uso de un antagonista de ActRIIB para disminuir la sobrecarga de hierro en un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. Los antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse para disminuir el contenido de hierro en el hígado de un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. Los antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse para disminuir el contenido de hierro en el bazo de un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. Los antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse para disminuir el contenido de hierro en el corazón de un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. El antagonista de ActRIIB puede administrarse antes del tratamiento con el inhibidor de la cinasa Janus. El antagonista de ActRIIB puede administrarse tras el tratamiento con el inhibidor de la cinasa Janus. El antagonista de ActRIIB puede administrarse simultáneamente con el inhibidor de la cinasa Janus. Un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus puede haber sido tratado con un agente que inhiba una o más de las cinasas Janus seleccionadas del grupo que consiste en: JAK1, JAK2 y JAK3. El inhibidor de la cinasa Janus puede inhibir la transducción de señales de uno o más de JAK1, JAK2 y JAK3 en un ensayo en células. Por ejemplo, un paciente puede ser tratado con uno o más inhibidores de la cinasa Janus seleccionados del grupo que consiste en: ruxolitinib, fedratinib (SAR302503), monoelotinib (CYT387), pacritinib, lestaurtinib, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 y AT-9283. Un paciente puede ser tratado con ruxolitinib.

Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que se utilizará de acuerdo con los procedimientos y usos descritos en el presente documento es un agente que inhibe al menos GDF11 (por ejemplo, un antagonista de GDF11). Los efectos de la inhibición de GDF11 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos al GDF 11. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos al GDF 11 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiben GDF11 de acuerdo con los procedimientos y usos descritos en el presente documento, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe GDF11 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7.

Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhiba al menos GDF8 (por ejemplo, un antagonista de GDF8). Los efectos de la inhibición de GDF8 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a GDF8. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a GDF8 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiban GDF8, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe GDF8 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7.

Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhiba al menos GDF3 (por ejemplo, un antagonista de GDF3). Los efectos de la inhibición de GDF3 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a GDF3. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a GDF3 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiban

GDF3, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe GDF3 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7.

Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhiba al menos BMP6 (por ejemplo, un antagonista de BMP6). Los efectos de la inhibición de BMP6 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a BMP6. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a BMP6 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiban BMP6, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe BMP6 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7.

Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhiba al menos BMP10 (por ejemplo, un antagonista de BMP10). Los efectos de la inhibición de BMP10 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a BMP10. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, de la divulgación se une al menos a BMP 10 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiban BMP10, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. Un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe BMP10 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7.

En determinados aspectos también descritos en el presente documento, pero no cubiertos por la invención reivindicada, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, es un agente que inhibe al menos la activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE) (por ejemplo, un antagonista de activina). Los efectos sobre la inhibición de la activina pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, en algunas realizaciones no reivindicadas según la invención reivindicada, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, de la divulgación puede unirse al menos a activina. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, de la divulgación se une al menos a activina con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). De acuerdo con la invención reivindicada, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que se utilizará de acuerdo con los procedimientos y usos descritos en el presente documento no se une sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a la activina A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M) y/o inhibe la actividad de la activina A.

En determinados aspectos no reivindicados, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que se utilizará de acuerdo con los procedimientos y usos descritos en el presente documento es un agente que inhibe al menos ActRIIB (por ejemplo, un antagonista de ActRIIB). Los efectos de la inhibición de ActRIIB pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, en algunas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a ActRIIB. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, se une al menos a ActRIIB con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). En dichas realizaciones no reivindicadas pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiben ActRIIB, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. En algunas de dichas

realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe ActRIIB puede inhibir además una o más de las siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ALK4, ALK5 y ALK7.

5 En determinados aspectos no reivindicados, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhibe al menos ALK4 (por ejemplo, un antagonista de ALK4). Los efectos de la inhibición de ALK4 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, en algunas de dichas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a ALK4. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. En algunas de dichas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, se une al menos a ALK4 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Como se describe en el presente documento, pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiben ALK4, por ejemplo, trampas de ligando (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe ALK4 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK5 y ALK7.

En determinados aspectos no reivindicados, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhibe al menos ALK5 (por ejemplo, un antagonista de ALK5). Los efectos de la inhibición de ALK5 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, en algunas de dichas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a ALK5. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. En algunas de dichas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, de la divulgación se une al menos a ALK5 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiban ALK5, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe ALK5 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4 y ALK7.

En determinados aspectos no reivindicados, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede ser un agente que inhibe al menos ALK7 (por ejemplo, un antagonista de ALK7). Los efectos de la inhibición de ALK7 pueden determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo en células, incluidos los descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo indicador de la transducción de señales de Smad). Por lo tanto, en algunas de dichas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, puede unirse al menos a ALK7. La actividad de unión al ligando puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad de unión, incluidos los descritos en el presente documento. En algunas de dichas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, se une al menos a ALK7 con una K_D de al menos 1×10^{-7} M (por ejemplo, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M, o al menos 1×10^{-12} M). Pueden utilizarse diversos antagonistas de ActRIIB que inhiban ALK7, incluidos, por ejemplo, trampas de ligandos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB, trampas de GDF, polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG), anticuerpos, moléculas pequeñas, secuencias de nucleótidos y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones no reivindicadas, un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, que inhibe ALK7 puede inhibir además uno o más de los siguientes: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y/o activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK5 y ALK4.

En parte, la divulgación se refiere a antagonistas de ActRIIB que son polipéptidos de ActRIIB. La expresión "polipéptido de ActRIIB" se refiere colectivamente a polipéptidos de ActRIIB naturales, así como a truncamientos y variantes de los mismos como los descritos en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos trampa de GDF). Los polipéptidos de ActRIIB pueden comprender, consistir fundamentalmente o consistir en un dominio de unión al ligando de un polipéptido de ActRIIB o una forma modificada (variante) del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB puede comprender, consistir fundamentalmente o consistir en un dominio de unión al ligando de ActRIIB de un polipéptido de ActRIIB, por ejemplo, una porción del dominio extracelular de ActRIIB. Preferentemente, los polipéptidos de ActRIIB que se utilizarán de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento son polipéptidos solubles.

En determinados aspectos, la divulgación se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de ActRIIB y usos del mismo. De acuerdo con la invención, un polipéptido de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos

[illegible]

93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, en la que el polipéptido de ActRIIB comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones preferidas de acuerdo con la invención reivindicada, un polipéptido de ActRIIB puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58. En determinadas realizaciones también descritas en el presente documento, pero no cubiertas por la invención reivindicada, los polipéptidos de ActRIIB no comprenden un aminoácido ácido en la posición correspondiente a L79 de SEQ ID NO: 1.

Como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ActRIIB y sus variantes (trampas de GDF) pueden ser homomultímeros, por ejemplo, homodímeros, homotrímeros, homotetrámeros, homopentámeros y complejos de homomultímeros de orden superior. Los polipéptidos de ActRIIB y sus variantes pueden ser homodímeros. Los dímeros de polipéptidos de ActRIIB descritos en el presente documento pueden comprender un primer polipéptido de ActRIIB asociado covalentemente, o no covalentemente, con un segundo polipéptido de ActRIIB, en los que el primer polipéptido comprende un dominio de ActRIIB y una secuencia de aminoácidos de un primer miembro (o segundo miembro) de un par de interacción (por ejemplo, un dominio constante de una inmunoglobulina) y el segundo polipéptido comprende un polipéptido de ActRIIB y una secuencia de aminoácidos de un segundo miembro (o primer miembro) del par de interacción.

Los polipéptidos de ActRIIB, incluidas sus variantes (por ejemplo, las trampas de GDF), pueden ser proteínas de fusión. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB puede ser una proteína de fusión que comprende un dominio de polipéptido de ActRIIB y uno o más dominios de polipéptidos heterólogos (no son de ActRIIB). Un polipéptido de ActRIIB puede ser una proteína de fusión que tiene, como dominio, una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión al ligando de un receptor de ActRIIB o una variante del mismo) y uno o más dominios heterólogos que proporcionan una propiedad deseable, tal como una farmacocinética mejorada, una purificación más fácil, el transporte dirigido a tejidos concretos, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de las siguientes propiedades: estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos de proteínas, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Un dominio de polipéptido de ActRIIB de una proteína de fusión puede estar conectado directamente (fusionado) a uno o más dominios de polipéptidos heterólogos, o puede introducirse una secuencia intermedia, tal como un conector, entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ActRIIB y la secuencia de aminoácidos de uno o más dominios heterólogos. Una proteína de fusión de ActRIIB puede comprender un conector relativamente desestructurado situado entre el dominio heterólogo y el dominio de ActRIIB. Este conector no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que estén relativamente exentos de estructura secundaria. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas. Algunos ejemplos de conectores incluyen, entre otros, las secuencias TGGG (SEQ ID NO: 18), SGGG (SEQ ID NO: 19), TGGGG (SEQ ID NO: 16), SGGGG (SEQ ID NO: 17), GGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGG (SEQ ID NO: 15) y GGG (SEQ ID NO: 14). Las proteínas de fusión de ActRIIB pueden comprender un dominio constante de una inmunoglobulina, incluida, por ejemplo, la porción Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos derivada de un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA (IgA1 o IgA2), IgE o IgM. Por ejemplo, una porción Fc de un dominio de inmunoglobulina puede comprender, consistir fundamentalmente o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-13. Tales dominios de inmunoglobulina pueden comprender una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, delecciones, adiciones y/o sustituciones) que confieren una actividad Fc alterada, por ejemplo, disminución de una o más funciones efectoras de Fc. Una proteína de fusión de ActRIIB puede comprender una secuencia de aminoácidos según la fórmula A-B-C. Por ejemplo, la porción B puede ser un polipéptido de ActRIIB truncado en el N- y C-terminal como se describe en el presente documento. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y ambas porciones A y C son heterólogas a B. Las porciones A y/o C pueden estar unidas a la porción B mediante una secuencia conectora. Una proteína de fusión de ActRIIB puede incluir una secuencia líder. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de ActRIIB nativa o una secuencia líder heteróloga. La secuencia líder puede ser una secuencia líder del activador del plasminógeno tisular ("tissue plasminogen activator", TPA).

Un polipéptido de ActRIIB, incluidas sus variantes (por ejemplo, trampas de GDF), puede comprender una subsecuencia de purificación, tal como un marcador de epítipo, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido de ActRIIB puede comprender uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y/o un aminoácido conjugado con un resto lipídico. Los polipéptidos de ActRIIB pueden comprender al menos un azúcar N-enlazado, y pueden incluir dos, tres o más azúcares N-enlazados. Dichos polipéptidos también pueden comprender azúcares O-enlazados. En general, es preferible que los polipéptidos de ActRIIB se expresen en una línea celular de mamífero que medie una glucosilación natural adecuada del polipéptido para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Los polipéptidos de ActRIIB pueden producirse en una diversidad de líneas celulares que glucosilan la proteína de forma

adecuada para el uso en el paciente, incluidas células de insecto o de levadura manipuladas y células de mamífero, tales como células COS, CHO, HEK y NSO. Un polipéptido de ActRIIB puede estar glucosilado y puede tener un patrón de glucosilación que puede obtenerse a partir de una línea celular de ovario de hámster chino. Los polipéptidos de ActRIIB pueden presentar una semivida sérica de al menos 4, 6, 12, 24, 36, 48 o 72 horas en un mamífero (por ejemplo, un ratón o un ser humano). Opcionalmente, ActRIIB puede presentar una semivida sérica de al menos 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25 o 30 días en un mamífero (por ejemplo, un ratón o un ser humano).

En el presente documento también se divulgan preparados farmacéuticos que comprenden uno o más antagonistas de ActRIIB de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un preparado farmacéutico también puede comprender uno o más agentes activos adicionales, tales como un compuesto que se utiliza para tratar la mielofibrosis, en concreto para tratar o prevenir una o más complicaciones de la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis) y/o un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. En general, el preparado farmacéutico preferentemente será apirógeno (es decir, no contiene pirógenos en la medida exigida por la normativa que regula la calidad de los productos de uso terapéutico).

En determinados casos, al administrar un antagonista de ActRIIB, o una combinación de antagonistas, de la divulgación a trastornos o afecciones descritos en el presente documento, puede ser deseable controlar los efectos en los glóbulos rojos durante la administración del antagonista de ActRIIB, o determinar o ajustar la dosis del antagonista de ActRIIB, a fin de reducir los efectos no deseados en los glóbulos rojos. Por ejemplo, el aumento de los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o hematocrito pueden provocar un aumento indeseable de la tensión arterial.

En determinados aspectos, que también se describen en el presente documento, pero que no están incluidos en la invención reivindicada, el antagonista de ActRIIB es un anticuerpo o una combinación de anticuerpos. El anticuerpo puede unirse al menos a ActRIIB. Un anticuerpo que se une a ActRIIB puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a ActRIIB puede inhibir uno o más ligandos de la superfamilia de TGF-beta, receptores de tipo I de la superfamilia de TGF-beta o correceptores de la superfamilia TGF-beta, impidiendo que se unan a ActRIIB. Un anticuerpo que se une a ActRIIB puede inhibir la unión a ActRIIB de uno o más ligandos de la superfamilia de TGF-beta seleccionados del grupo formado por: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE), GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9 y BMP5. Un anticuerpo puede unirse al menos al GDF 11. Un anticuerpo que se une a GDF 11 puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a GDF11 puede inhibir la unión de GDF11-ActRIIB. Un anticuerpo puede unirse al menos a GDF8. Un anticuerpo que se une a GDF8 puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a GDF8 puede inhibir la unión de GDF8-ActRIIB. Un anticuerpo puede unirse al menos a BMP6. Un anticuerpo que se une a BMP6 puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a BMP6 puede inhibir la unión de BMP6-ActRIIB. Un anticuerpo puede unirse a BMP10. Un anticuerpo que se une al menos a BMP10 puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a BMP10 puede inhibir la unión de BMP10-ActRIIB. El anticuerpo puede unirse al menos a GDF3. Un anticuerpo que se une a GDF3 puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a GDF3 puede inhibir la unión de GDF3-ActRIIB. El anticuerpo puede unirse al menos a la activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE). Un anticuerpo que se une a activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE) puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a la activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE) puede inhibir la unión de activina-ActRIIB. El anticuerpo puede unirse a la activina B. Un anticuerpo que se une a la activina B puede inhibir la transducción de señales de ActRIIB, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a la activina B puede inhibir la unión de activina B-ActRIIB. El anticuerpo puede ser un anticuerpo multiespecífico, o una combinación de anticuerpos multiespecíficos que se unen a uno o más de ActRIIB, GDF11, GDF8, activina A, activina B, BMP6 y BMP10. Un anticuerpo puede unirse al menos a ALK4. Un anticuerpo que se une a ALK4 puede inhibir la transducción de señales de ALK4, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a ALK4 puede inhibir uno o más ligandos de ActRIIB, receptores de tipo II o correceptores, impidiendo que se unan a ALK4. Un anticuerpo que se une a ALK4 puede inhibir la unión a ALK4 de uno o más ligandos de ActRIIB seleccionados del grupo que consiste en: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 y GDF3. El anticuerpo puede unirse al menos a ALK5. Un anticuerpo que se une a ALK5 puede inhibir la transducción de señales de ALK4, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a ALK5 puede inhibir uno o más ligandos de ActRIIB, receptores de tipo II o correceptores, impidiendo que se unan a ALK5. Un anticuerpo que se une a ALK5 puede inhibir la unión a ALK5 de uno o más ligandos de ActRIIB seleccionados del grupo que consiste en: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 y GDF3. El anticuerpo puede unirse al menos a ALK7. Un anticuerpo que se une a ALK7 puede

inhibir la transducción de señales de ALK4, opcionalmente medida en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Un anticuerpo que se une a ALK7 puede inhibir uno o más ligandos de ActRIIB, receptores de tipo II o correceptores, impidiendo que se unan a ALK7. Un anticuerpo que se une a ALK7 puede inhibir la unión a ALK7 de uno o más ligandos de ActRIIB seleccionados del grupo que consiste en: activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 y GDF3. El anticuerpo puede unirse al menos a GDF11. El anticuerpo multiespecífico, o una combinación de anticuerpos multiespecíficos, puede inhibir la transducción de señales en un ensayo en células de uno o más de: ActRIIB, GDF11, GDF8, activina A, activina B, GDF3, BMP6 y BMP10. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monocatenario, un fragmento F(ab')₂, un diacuerpo monocatenario, un fragmento Fv monocatenario en tándem, un diacuerpo monocatenario en tándem o una proteína de fusión que comprenda un diacuerpo monocatenario y al menos una parte de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina.

En determinados aspectos, que también se describen en el presente documento, pero que no están incluidos en la invención reivindicada, el antagonista de ActRIIB es un inhibidor de molécula pequeña o una combinación de inhibidores de molécula pequeña. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos ActRIIB. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos ALK4. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos ALK5. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos ALK7. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos GDF 11. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos GDF8. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos BMP6. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos BMP10. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos GDF3. El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE). El inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de al menos activina B.

En determinados aspectos, que también se describen en el presente documento, pero que no están incluidos en la invención reivindicada, el antagonista de ActRIIB es un inhibidor de ácido nucleico o una combinación de inhibidores de ácido nucleico. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos ActRIIB. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos ALK4. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos ALK5. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos ALK7. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos GDF11. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos GDF8. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos BMP6. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos BMP10. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos GDF3. El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE y activina BE). El inhibidor de ácido nucleico puede ser un inhibidor de al menos activina B.

En determinados aspectos también descritos en el presente documento, pero no incluidos en la invención reivindicada, el antagonista de ActRIIB es un polipéptido de follistatina. El polipéptido de follistatina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. El polipéptido de follistatina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. El polipéptido de follistatina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65. El polipéptido de follistatina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. El polipéptido de follistatina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67.

En determinados aspectos también descritos en el presente documento, pero no incluidos en la invención reivindicada, el antagonista de ActRIIB es un polipéptido de FLRG. El polipéptido de FLRG puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una alineación de los dominios extracelulares de ActRIIA humana (SEQ ID NO: 36) y ActRIIB humana (SEQ ID NO: 2) con los residuos que se deducen en el presente documento, basándose en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA, para ponerse en contacto directamente con el ligando indicado con recuadros.

La figura 2 muestra una alineación de múltiples secuencias de diferentes proteínas de ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humana (SEQ ID NO: 37-43), así como una secuencia de ActRII de consenso derivada de la alineación (SEQ ID NO: 44).

5 La figura 3 muestra la secuencia completa de aminoácidos de la trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 45), que incluye la secuencia líder TPA (subrayado doble), el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en SEQ ID NO: 1; subrayado simple) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que la glicina que, según la secuenciación, es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

10 Las figuras 4A y 4B muestran una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(L79D 20-134)-hFc. SEQ ID NO: 48 corresponde a la cadena sentido, y SEQ ID NO: 49 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1-66) está indicado con subrayado doble, y el dominio extracelular ActRIIB (nucleótidos 76-420) está indicado con subrayado simple.

15 La figura 5 muestra la secuencia completa de aminoácidos de la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 50), que incluye el líder TPA (subrayado doble), el dominio extracelular truncado ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1; subrayado simple) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que el glutamato que, según la secuenciación, es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

20 Las figuras 4A y 4B muestran una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 51 corresponde a la cadena sentido, y SEQ ID NO: 52 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1-66) está indicado con subrayado doble, y el dominio extracelular truncado ActRIIB (nucleótidos 76-396) está indicado con subrayado simple. También se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1).

25 La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sin líder (SEQ ID NO: 53). El dominio extracelular truncado de ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que el glutamato que, según la secuenciación, es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

30 La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131) sin el líder, el dominio hFc y el conector (SEQ ID NO: 54). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado y resaltado, al igual que el glutamato que, según la secuenciación, es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

35 Las figuras 9A y 9B muestran una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 55 corresponde a la cadena sentido, y SEQ ID NO: 56 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, el dominio extracelular truncado ActRIIB (nucleótidos 76-396) está subrayado, y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje del dominio extracelular están doblemente subrayadas y resaltadas (compárese con SEQ ID NO: 51, figuras 6A y 6B). También se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1).

40 La figura 10 muestra los nucleótidos 76-396 (SEQ ID NO: 57) de la secuencia de nucleótidos alternativa mostrada en las figuras 9A y 9B (SEQ ID NO: 55). Las mismas sustituciones de nucleótidos indicadas en las figuras 9A y 9B también están subrayadas y resaltadas en este caso. SEQ ID NO: 57 codifica únicamente el dominio extracelular truncado de ActRIIB (correspondiente a los residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) con una sustitución L79D, por ejemplo, ActRIIB(L79D 25-131).

La figura 11 muestra la alineación de múltiples secuencias de los dominios Fc procedentes de los isotipos de IgG humana utilizando Clustal 2.1. Las regiones bisagra se indican con subrayado discontinuo.

45 La figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos completa y sin procesar de ActRIIB(25-131)-hFc (SEQ ID NO: 58). El líder TPA (residuos 1-22) y el dominio extracelular ActRIIB doblemente truncado (residuos 24-131, utilizando la numeración basada en la secuencia nativa en SEQ ID NO: 1) están subrayados. Se resalta el glutamato que, según la secuenciación, es el aminoácido N-terminal de la proteína de fusión madura, que está en la posición 25 en relación con SEQ ID NO: 1.

50 Las figuras 13A y 13B muestran una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(25-131)-hFc (la cadena codificante se muestra en la parte superior, SEQ ID NO: 59, y el complemento se muestra en la parte inferior 3'-5', SEQ ID NO: 60). Las secuencias que codifican el líder TPA (nucleótidos 1-66) y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 73-396) están subrayadas. También se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente de ActRIIB(25-131).

55 Las figuras 14A y 14B muestran una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB(25-131)-hFc (la cadena codificante se muestra en la parte superior, SEQ ID NO: 61, y el complemento se muestra en la parte inferior 3'-5', SEQ ID NO: 62). Esta secuencia confiere un mayor nivel de expresión de proteínas a los transformantes iniciales, lo que hace que el desarrollo de líneas celulares sea un proceso más rápido. Las secuencias que codifican el líder TPA

(nucleótidos 1-66) y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 73-396) están subrayadas, y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje del ECD (véanse las figuras 13A y 13B) están resaltadas. También se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente de ActRIIB(25-131).

Descripción detallada de la invención

5 1. Visión general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran diversidad de tipos celulares, tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia desempeñan importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en diversos procesos de diferenciación, tales como la adipogénesis, la miogénesis, la condrogénesis, la cardiogénesis, la hematopoyesis, la neurogénesis y la diferenciación de células epiteliales. Mediante la manipulación de la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, a menudo es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas bovinas piemontesa y belga azul son portadoras de una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que provoca un marcado aumento de la masa muscular [véase, por ejemplo, Grobet *et al.* (1997), Nat. Genet., 17(1):71-74]. Además, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 se asocian a un aumento de la masa muscular y, al parecer, a una fuerza excepcional [véase, por ejemplo, Schuelke *et al.* (2004), N. Engl. J. Med., 350:2682-2688].

Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa de tipo I y de tipo II, que fosforilan y activan proteínas SMAD corriente abajo (por ejemplo, proteínas SMAD 1, 2, 3, 5 y 8) tras la estimulación con ligando [véase, por ejemplo, Massagué (2000), Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 1:169-178]. Estos receptores de tipo I y II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con una especificidad prevista de serina/treonina. Los receptores de tipo I son fundamentales para la transducción de señales. Los receptores de tipo II son necesarios para la unión de ligandos y para la activación de los receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable tras la unión del ligando, lo que da lugar a la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

Dos receptores de tipo II relacionados (ActRII), ActRIIA y ActRIIB, han sido identificados como los receptores de tipo II para activinas [véase, por ejemplo, Mathews y Vale (1991), Cell, 65:973-982; y Attisano *et al.* (1992), Cell, 68: 97-108]. Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , incluidas, por ejemplo, BMP6, BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 [véase, por ejemplo, Yamashita *et al.* (1995), J. Cell. Biol., 130:217-226; Lee y McPherron (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9306-9311; Yeo y Whitman (2001), Mol. Cell, 7: 949-957; y Oh *et al.* (2002), Genes Dev., 16:2749-2754]. ALK4 es el principal receptor de tipo I para las activinas, en concreto para la activina A, y ALK-7 puede actuar también como receptor para otras activinas, en concreto para la activina B.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Existen tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$, 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 de TGF-beta, las activinas son factores distintivos y multifuncionales que pueden estimular la producción hormonal en células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de células neuronales, influir positiva o negativamente en el avance del ciclo celular en función del tipo de célula, e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios [DePaolo *et al.* (1991), Proc. Soc. Ep. Biol. Med., 198:500-512; Dyson *et al.* (1997), Curr. Biol., 7:81-84; y Woodruff (1998), Biochem. Pharmacol., 55:953-963]. Además, se descubrió que el factor de diferenciación eritroide ("erythroid differentiation factor", EDF) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A [Murata *et al.* (1988), PNAS, 85:2434]. Se ha sugerido que la activina A estimula la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la transducción de señales de la activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona foliculoestimulante ("follicle-stimulating hormone", FSH) de la hipófisis, la activina estimula la secreción y la síntesis de FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y la síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a ella son la folistatina (FS), la proteína relacionada con la folistatina ("follistatin-related protein", FSRP, también conocida como FLRG o FSTL3) y la α_2 -macroglobulina.

Como se describe en el presente documento, los agentes que se unen a la "activina A" son agentes que se unen específicamente a la subunidad β_A , ya sea en el contexto de una subunidad β_A aislada o como en forma de un complejo dimérico (por ejemplo, un homodímero $\beta_A\beta_A$ o un heterodímero $\beta_A\beta_B$). En el caso de un complejo heterodimérico (por ejemplo, un heterodímero $\beta_A\beta_B$), los agentes que se unen a la "activina A" son específicos para epítomos presentes dentro de la subunidad β_A , pero no se unen a epítomos presentes dentro de la subunidad que no es β_A del complejo (por ejemplo, la subunidad β_B del complejo). Del mismo modo, los agentes divulgados en el presente documento que antagonizan (inhiben) la "activina A" son agentes que inhiben una o más actividades mediadas por una subunidad β_A ,

ya sea en el contexto de una subunidad β aislada o como en forma de un complejo dimérico (por ejemplo, un homodímero $\beta_A\beta_A$ o un heterodímero $\beta_A\beta_B$). En el caso de los heterodímeros $\beta_A\beta_B$, los agentes que inhiben la "activina A" son agentes que inhiben específicamente una o más actividades de la subunidad β_A , pero no inhiben la actividad de la subunidad que no es β_A del complejo (por ejemplo, la subunidad β_B del complejo). Este principio se aplica también a los agentes que se unen y/o inhiben la "activina B", la "activina C" y la "activina E". Los agentes divulgados en el presente documento que antagonizan la "activina AB" son agentes que inhiben una o más actividades mediadas por la subunidad β_A y una o más actividades mediadas por la subunidad β_B .

El factor de crecimiento y diferenciación-8 ("growth and differentiation factor-8", GDF8) también se conoce como miostatina. El GDF8 es un regulador negativo de la masa de músculo esquelético. El GDF8 se expresa en gran medida en el músculo esquelético en desarrollo y adulto. La mutación nula de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético [McPherron *et al.*, *Nature* (1997), 387:83-90]. Aumentos similares de la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones naturales de GDF8 en bovinos [véase, por ejemplo, Ashmore *et al.* (1974), *Growth*, 38:501-507; Swatland y Kieffer (1994), *J. Anim. Sci.*, 38:752-757; McPherron y Lee (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12457-12461; y Kambadur *et al.* (1997), *Genome Res.*, 7:910-915] y, sorprendentemente, en seres humanos [véase, por ejemplo, Schuelke *et al.* (2004), *N. Engl. J. Med.*, 350:2682-2688]. Los estudios también han demostrado que el desgaste muscular asociado a la infección por VIH en seres humanos va acompañado de aumentos en la expresión de la proteína de GDF8 [véase, por ejemplo, González-Cadavid *et al.* (1998), *PNAS*, 95:14938-14943]. Además, el GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, la creatina cinasa) y modular la proliferación de células mioblásticas [véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 00/43781]. El propéptido de GDF8 puede unirse de forma no covalente al dímero maduro del dominio GDF8, inactivando su actividad biológica [véase, por ejemplo, Miyazono *et al.* (1988), *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield *et al.* (1988), *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654; y Brown *et al.* (1990), *Growth Factors*, 3: 35-43]. Otras proteínas que se unen a GDF8 o a proteínas estructuralmente relacionadas e inhiben su actividad biológica incluyen la follistatina y, posiblemente, las proteínas relacionadas con la follistatina [véase, por ejemplo, Gamer *et al.* (1999), *Dev. Biol.*, 208: 222-232].

El factor de crecimiento y diferenciación-11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada [McPherron *et al.* (1999), *Nat. Genet.*, 22: 260-264]. El GDF11 se expresa en la yema de la cola, la yema de las extremidades, los arcos maxilar y mandibular y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón [véase, por ejemplo, Nakashima *et al.* (1999), *Mech. Dev.*, 80: 185-189]. El GDF11 desempeña un papel particular en el patrón de los tejidos mesodérmicos y neurales [véase, por ejemplo, Gamer *et al.* (1999), *Dev. Biol.*, 208:222-232]. Se ha demostrado que el GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de las extremidades de los pollitos [véase, por ejemplo, Gamer *et al.* (2001), *Dev. Biol.*, 229:407-420]. La expresión de GDF 11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de forma similar al GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede presentar actividades relacionadas con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se descubrió que el GDF 11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo [véase, por ejemplo, Wu *et al.* (2003), *Neuron*, 37:197-207].

En parte, la presente divulgación se relaciona con el descubrimiento de que un antagonista (inhibidor) de ActRIIB puede usarse para tratar a pacientes con mielofibrosis, y en especial mejora diversas complicaciones de la enfermedad, incluidas, por ejemplo, la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis. En concreto, los datos presentados en el presente documento demuestran que un polipéptido trampa de GDF disminuye la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis en un modelo *JAK2V617F* de mielofibrosis. En consecuencia, la divulgación se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis, en especial el tratamiento o la prevención de una o más complicaciones de la mielofibrosis (esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis) como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los términos y expresiones utilizados en esta memoria descriptiva suelen tener sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se utiliza cada término y expresión. Determinados términos y expresiones se analizan a continuación o en otras partes de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y procedimientos de la invención y cómo llevarlos a cabo y utilizarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término o expresión se desprenderá del contexto específico en el que se utilice el término o expresión.

"Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluidas proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Dichas proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) tienen homología de secuencia, como refleja su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas. Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no referirse a un origen evolutivo común.

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

- "Porcentaje (%) de identidad de secuencia", con respecto a una secuencia polipeptídica (o nucleotídica) de referencia, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos) en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos) en la secuencia polipeptídica (nucleotídica) de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diferentes maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático de acceso público, tal BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias comparadas. No obstante, a efectos del presente documento, los valores de porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos (ácidos nucleicos) se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el número de registro de derechos de autor de EE. UU. n.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible y es de acceso público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluido UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.
- "Agonizar", en todas sus formas gramaticales, se refiere al proceso de activar una proteína y/o gen (por ejemplo, activando o amplificando la expresión génica de esa proteína o induciendo a una proteína inactiva a entrar en un estado activo) o aumentar la actividad de una proteína y/o gen.
- "Antagonizar", en todas sus formas gramaticales, se refiere al proceso de inhibir una proteína y/o gen (por ejemplo, inhibiendo o disminuyendo la expresión génica de esa proteína o induciendo a una proteína activa a entrar en un estado inactivo) o de disminuir la actividad de una proteína y/o gen.
- El término "aproximadamente" utilizado en relación con un valor numérico a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones indica un intervalo de precisión, familiar y aceptable para un experto en la materia. En general, dicho intervalo de precisión es de $\pm 10\%$. Como alternativa, y especialmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente ≤ 5 veces y más preferentemente ≤ 2 veces de un valor dado.
- Los intervalos numéricos aquí divulgados incluyen los números que definen los intervalos.
- Los términos "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto en el que se utiliza el término indique claramente lo contrario. Los términos "un" (o "una"), así como los términos "uno o más" y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento. Además, "y/o", cuando se utiliza en el presente documento, debe entenderse como la divulgación específica de cada una de las dos o más características o componentes especificados, con o sin la otra. Por lo tanto, el término "y/o" utilizado en una expresión como "A y/o B" incluye "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" utilizado en una frase como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes elementos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).
- A lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "comprende" o variaciones, tales como "que comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de una entidad o grupos de entidades, pero no la exclusión de cualquier otra entidad o grupo de entidades.

2. Antagonistas de ActRIIB

- En parte, la presente divulgación se relaciona con el descubrimiento de que un antagonista (inhibidor) de ActRIIB puede usarse para tratar a pacientes con mielofibrosis, y en especial mejora diversas complicaciones de la enfermedad, incluidas, por ejemplo, la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis. En concreto, los datos presentados en el presente documento demuestran que un polipéptido trampa de GDF disminuye la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis en un modelo *JAK2V617F* de mielofibrosis. Si bien los polipéptidos trampa de GDF solubles pueden afectar a la mielofibrosis a través de un mecanismo distinto del antagonismo a ActRIIB [por ejemplo, la inhibición de uno o más de GDF11, GDF8, activina B, BMP6, GDF3 y BMP10 puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de agentes adicionales, incluidos, quizás, otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y dicha inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado, por ejemplo, sobre la mielofibrosis], la divulgación demuestra, no obstante, que los agentes terapéuticos deseables pueden seleccionarse basándose en el antagonismo a ActRIIB. Por lo tanto, aunque no se desea quedar restringido a un mecanismo de acción concreto, se espera que otros antagonistas de ActRIIB [por ejemplo, antagonistas del receptor de ActRIIB, antagonistas de uno o más ligandos de unión a ActRIIB (por ejemplo, GDF11, GDF8, activina, BMP6, GDF3 y BMP10), antagonistas de uno o más receptores de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), antagonistas de uno o más correceptores, antagonistas de uno o más componentes de la transducción de señales posteriores a ActRIIB (por ejemplo, Smads), o una combinación de tales antagonistas] serán útiles en el tratamiento de la mielofibrosis, en especial en el tratamiento o la prevención de diversas complicaciones asociadas a

la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular y fibrosis). Dichos agentes se denominan colectivamente en el presente documento "antagonistas de ActRIIB" o "inhibidores de ActRIIB".

A. Polipéptidos de ActRIIB y sus variantes

- 5 En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a polipéptidos de ActRIIB y variantes de los mismos (por ejemplo, trampas de GDF). En concreto, la divulgación proporciona procedimientos de uso de polipéptidos de ActRIIB, solos o junto con uno o más tratamientos de apoyo adicionales, para tratar la mielofibrosis, en concreto para tratar o prevenir una o más complicaciones de la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis) y/o un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus. Como se utiliza en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina de tipo IIB (ActRIIB) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación.
- 10 a ActRIIB en el presente documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión al ligando que comprende una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad prevista serina/treonina cinasa.
- 15 La expresión "polipéptido de ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como sus variantes (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Algunos ejemplos de tales polipéptidos de ActRIIB variantes se proporcionan a lo largo de la presente divulgación, así como en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2006/012627 y WO 2008/097541. La numeración de los aminoácidos de todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en el presente documento se basa en la numeración de la secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humana proporcionada a continuación (SEQ ID NO: 1), salvo que se indique específicamente lo contrario.
- 20

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

```

1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLGERCE
51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1)

```

- 25 El péptido señal se indica con un subrayado sencillo; el dominio extracelular se indica en negrita; y los posibles sitios de glucosilación endógena N-enlazados se indican con un subrayado doble.

La secuencia del polipéptido de ActRIIB extracelular procesado (maduro) es la siguiente:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLD
FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID
NO: 2).

```

- 30 La proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el N-terminal. La "cola" C-terminal del dominio extracelular se indica con un subrayado sencillo. La secuencia con la "cola" deletionada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWLD

FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3).

5 También se describe una forma de ActRIIB con una alanina en la posición 64 de SEQ ID NO: 1 (A64) en la bibliografía [Hilden *et al.* (1994), Blood, 83(8): 2163-2170]. Los solicitantes han comprobado que una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular de ActRIIB con la sustitución A64 tiene una afinidad relativamente baja por la activina y el GDF11. Por el contrario, la misma proteína de fusión de ActRIIB-Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y el GDF 11 en el intervalo de nanomolar bajo a picomolar alto. Por lo tanto, las secuencias con un R64 se utilizan como la secuencia de referencia "de tipo salvaje" para la ActRIIB humana en esta divulgación.

La forma de ActRIIB con una alanina en la posición 64 es la siguiente:

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG **RGEAETRECI** **YYNANWELER** **TNQSGLERCE**
 51 **GEQDKRLHCY** **ASWANSSGTI** **ELVKKGWLD** **DFNCYDRQEC** **VATEENPQVY**
 101 **FCCCEGNFCN** **ERFTHLPEAG** **GPEVITYEPPP** **TAPTLLTVLA** **YSLLPIGGLS**
 151 **LIVLLAFWMY** **RHRKPPYGHV** **DIHEDPGPPP** **PSPLVGLKPL** **QLLEIKARGR**
 201 **FGCVWKAQLM** **NDFVAVKIFP** **LQDKQSWQSE** **REIFSTPGMK** **HENLLQFIAA**
 251 **EKRGSNLEVE** **LWLITAFHDK** **GSLTDYLGKN** **IITWNECHV** **AETMSRGLSY**
 301 **LHEDVPWCRG** **EGHKPSIAHR** **DFKSKNVLLK** **SDLTAVLADF** **GLAVRFEPGK**
 351 **PPGDTHGQVG** **TRRYMAPEVL** **EGAINFQDA** **FLRIDMYAMG** **LVLWELVSRG**
 401 **KAADGPVDEY** **MLPFEEEIGQ** **HPSLEELQEV** **VVHKMRPTI** **KDHWLKHPLG**
 451 **AQLCVTIEEC** **WDHDAEARLS** **AGCVEERVSL** **IRRSVNGTTS** **DCLVSLVTSV**
 10 501 **TNVDLPPKES** **SI** (SEQ ID NO: 4)

El péptido señal se indica con un subrayado sencillo, y el dominio extracelular se indica en negrita.

La secuencia del polipéptido de ActRIIB extracelular procesado (maduro) de la forma alternativa A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGWLD

FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPTAPT (SEQ ID

NO: 5)

15 La proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el N-terminal. La "cola" C-terminal del dominio extracelular se indica con un subrayado sencillo. La secuencia con la "cola" delecionada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGWLD

FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 6)

20 A continuación, se muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIB humana (SEQ ID NO: 7), formada por los nucleótidos 25-1560 de la secuencia de referencia del Genbank NM_001106.3, que codifica los aminoácidos 1-513 del precursor de ActRIIB. La secuencia tal como se muestra proporciona una arginina en la posición 64 y puede modificarse para proporcionar una alanina en su lugar. La secuencia de señales aparece subrayada.

ES 2 984 470 T3

```

1  ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
51  CCGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
151 GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA
401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC
451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCCTA
501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTACGAGG CCTCTCATAC
901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGACAA
1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG
1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)

```

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de ActRIIB humana extracelular procesado es la siguiente (SEQ ID NO: 8):

```

1  GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC

```

(SEQ ID NO:8)

La secuencia tal como se muestra proporciona una arginina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una alanina en su lugar.

- En la figura 1 se ilustra una alineación de las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular de ActRIIB humana y del dominio extracelular de ActRIIA humana. Esta alineación indica los residuos de aminoácidos dentro de ambos receptores que se cree que se ponen en contacto directamente con los ligandos de ActRII. Por ejemplo, las estructuras compuestas de ActRII indican que el bolsillo de unión al ligando de ActRIIB está definido, en parte, por los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92, y E94 a F101. En estas posiciones, se espera que se toleren las mutaciones conservadoras.
- Además, ActRIIB está generalmente bien conservada entre los vertebrados, con grandes extensiones del dominio extracelular completamente conservadas. Por ejemplo, la figura 2 muestra una alineación de múltiples secuencias de un dominio extracelular de ActRIIB humana comparado con diferentes ortólogos de ActRIIB. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están muy conservados. Por consiguiente, a partir de estas alineaciones, es posible predecir posiciones clave de aminoácidos dentro del dominio de unión al ligando que son importantes para las actividades normales de unión al ligando de ActRIIB, así como predecir posiciones de aminoácidos que probablemente sean tolerantes a la sustitución sin alterar significativamente las actividades normales de unión al ligando de ActRIIB. Por lo tanto, un polipéptido variante de ActRIIB humana activo útil de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento puede incluir uno o más aminoácidos en posiciones correspondientes de la secuencia de otra ActRIIB de vertebrado, o puede incluir un residuo que sea similar al de las secuencias humanas o de otros vertebrados.
- Sin pretender establecer limitaciones, los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIB. L46 en el dominio extracelular humano (SEQ ID NO: 2) es una valina en ActRIIB de *Xenopus* (SEQ ID NO: 42), por lo que esta posición puede ser alterada, y opcionalmente puede ser alterada a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo no polar, tal como A. E52 en el dominio extracelular humano es una K en *Xenopus*, lo que indica que este sitio puede ser tolerante a una amplia diversidad de cambios, que incluyen residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 en el dominio extracelular humano es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, favoreciéndose los residuos polares, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 en el dominio extracelular humano es una Y en *Xenopus* y, por lo tanto, Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L debería ser tolerado. E111 en el dominio extracelular humano es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluidos D, R, K y H, así como Q y N. R112 en el dominio extracelular humano es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos básicos son tolerados en esta posición, incluidos R y H. A en la posición 119 en el dominio extracelular humano está relativamente poco conservado, y aparece como P en roedores (SEQ ID NO: 37 y 39) y V en *Xenopus*, por lo que prácticamente cualquier aminoácido debería ser tolerado en esta posición.
- Además, las proteínas ActRII se han caracterizado en la técnica en cuanto a las características estructurales/funcionales, especialmente con respecto a la unión al ligando [Attisano *et al.* (1992), *Cell*, 68(1):97-108; Greenwald *et al.* (1999), *Nature Structural Biology*, 6(1): 18-22; Allendorph *et al.* (2006), *PNAS*, 103 (20): 7643-7648; Thompson *et al.* (2003), *The EMBO Journal*, 22(7): 1555-1566; así como las patentes de EE. UU. n.ºs 7 709 605, 7 612 041 y 7 842 663]. Además de las enseñanzas del presente documento, estas referencias proporcionan una amplia orientación sobre cómo generar variantes de ActRII que conserven una o más actividades deseadas (por ejemplo, actividad de unión al ligando).
- Por ejemplo, un motivo estructural definitorio conocido como pliegue de toxina de tres dedos es importante para la unión al ligando de los receptores de tipo I y II y está formado por residuos de cisteína conservados situados en posiciones variables dentro del dominio extracelular de cada receptor monomérico [Greenwald *et al.* (1999), *Nat. Struct. Biol.*, 6:18-22; y Hinck (2012), *FEBS Lett.*, 586:1860-1870]. Por consiguiente, el núcleo de los dominios de unión al ligando de ActRIIB humana, delimitado por la más externa de estas cisteínas conservadas, corresponde a las posiciones 29-109 de SEQ ID NO: 1 (precursor de ActRIIB). Así, los aminoácidos estructuralmente menos ordenados que flanquean estas secuencias centrales demarcadas por cisteína pueden truncarse en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 residuos en el N-terminal y/o en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 residuos en el

C-terminal sin alterar necesariamente la unión al ligando. Algunos ejemplos de dominios extracelulares de ActRIIB para un truncamiento N-terminal y/o C-terminal incluyen las SEQ ID NO: 2, 3, 5 y 6.

Attisano *et al.* demostraron que una delección del nudo de prolina en el C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor por la activina. Una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la presente SEQ ID NO: 1, "ActRIIB(20-119)-Fc", tiene una unión reducida a GDF11 y a activina en relación con un ActRIIB(20-134)-Fc que incluye la región del nudo de prolina y el dominio de yuxtamembrana completo (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 7 842 663). Sin embargo, una proteína ActRIIB(20-129)-Fc conserva una actividad similar, aunque algo reducida, en relación con el tipo salvaje, a pesar de que la región del nudo de prolina está interrumpida. Así, se prevé que los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 (con respecto a SEQ ID NO: 1) sean todos activos, pero las construcciones que se detienen en 134 o 133 pueden ser las más activas. Del mismo modo, no se prevé que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 (con respecto a SEQ ID NO: 1) alteren la afinidad de unión al ligando en un alto margen. En apoyo de esto, en la técnica se sabe que las mutaciones de P129 y P130 (con respecto a SEQ ID NO: 1) no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, un polipéptido de ActRIIB de la presente divulgación puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), aunque se prevé que las formas que terminan en 109 y 119 o entre los mismos (por ejemplo, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 o 119) presenten una unión al ligando reducida. El aminoácido 119 (con respecto a la presente SEQ ID NO: 1) está poco conservado, por lo que se altera o trunca con facilidad. Los polipéptidos de ActRIIB que terminan en 128 (con respecto a SEQ ID NO: 1) o posterior deberían conservar la actividad de unión al ligando. Los polipéptidos de ActRIIB que terminan en 119 y 127 o entre los mismos (por ejemplo, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 o 127), con respecto a SEQ ID NO: 1, tendrán una capacidad de unión intermedia. Puede ser conveniente utilizar cualquiera de estas formas, en función del entorno clínico o experimental.

En el N-terminal de ActRIIB, se prevé que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes (con respecto a SEQ ID NO: 1) conservará la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 (con respecto a SEQ ID NO: 1) introduce una secuencia de glucosilación N-enlazada sin afectar sustancialmente a la unión al ligando [patente de EE. UU. n.º 7 842 663]. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de señal de corte y la región entrecruzada con cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29, son bien toleradas. En concreto, los polipéptidos de ActRIIB que comienzan en las posiciones 20, 21, 22, 23 y 24 (con respecto a SEQ ID NO: 1) deberían conservar la actividad general de unión al ligando, y los polipéptidos de ActRIIB que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 (con respecto a SEQ ID NO: 1) también se espera que conserven la actividad de unión al ligando. Se ha demostrado, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7 842 663, que, sorprendentemente, una construcción de ActRIIB que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

En conjunto, una fórmula general para una porción activa (por ejemplo, una porción de unión al ligando) de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, los polipéptidos de ActRIIB pueden, por ejemplo, comprender, consistir fundamentalmente o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una porción de ActRIIB que comienza en un residuo correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 20-29 (por ejemplo, que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de SEQ ID NO: 1 y que termina en una posición correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 109-134 (por ejemplo, que termina en cualquiera de los aminoácidos 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de SEQ ID NO: 1. Otros ejemplos incluyen polipéptidos que comienzan en una posición de 20-29 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) o 21-29 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) y terminan en una posición de 119-134 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134), 119-133 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133), 129-134 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 129, 130, 131, 132, 133 o 134), o 129-133 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 129, 130, 131, 132 o 133) de SEQ ID NO: 1. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición de 20-24 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 20, 21, 22, 23 o 24), 21-24 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 21, 22, 23 o 24) o 22-25 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 22, 23 o 25) y terminan en una posición de 109-134 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134), 119-134 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) o 129-134 (por ejemplo, cualquiera de las posiciones 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de SEQ ID NO: 1. También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, en concreto las que tienen al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la porción correspondiente de SEQ ID NO: 1.

Las variaciones descritas en el presente documento pueden combinarse de diversas maneras. Las variantes de ActRIIB pueden comprender no más de 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión al ligando. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede ser especialmente

bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se señaló anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73 (con respecto a SEQ ID NO: 1). Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) en realidad mejora la unión al ligando en el trasfondo de A64 y, por lo tanto, se espera que no tenga ningún efecto perjudicial sobre la unión al ligando en el trasfondo de R64 [patente de EE. UU. n.º 7 842 663]. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el trasfondo de A64, demostrando así que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A es mal tolerado, R64K es bien tolerado y, por lo tanto, otro residuo básico, tal como H, puede ser tolerado en la posición 64 [patente de EE. UU. n.º 7 842 663]. Además, los resultados del programa de mutagénesis descrito en la técnica indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que suele ser beneficioso conservar. Con respecto a SEQ ID NO: 1, éstas incluyen la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo, y especialmente triptófano), la posición 37 (ácido, y especialmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, especialmente fenilalanina o tirosina). Así, la divulgación proporciona un marco de aminoácidos que pueden conservarse en los polipéptidos de ActRIIB. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, especialmente E, D, R o K), todas ellas con respecto a SEQ ID NO: 1.

Se ha demostrado previamente que la adición de otro sitio de glucosilación N-enlazado (N-X-S/T) en el dominio extracelular de ActRIIB es bien tolerada (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7 842 663). Por lo tanto, las secuencias N-X-S/T pueden introducirse generalmente en posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definido en la figura 1 en el polipéptido de ActRIIB de la presente divulgación. Los sitios especialmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134 (con respecto a SEQ ID NO: 1). También pueden introducirse secuencias N-X-S/T en el conector entre la secuencia de ActRIIB y un dominio Fc u otro componente de fusión. Dicho sitio puede introducirse con un esfuerzo mínimo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o introduciendo un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Así, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glucosilación N-enlazado son: A24N, R64N, S67N (potencialmente combinado con una alteración N65A), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T (con respecto a SEQ ID NO: 1). Cualquier S que se prevea glucosilada puede alterarse a una T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección que ofrece la glucosilación. Del mismo modo, cualquier T que se prevea glucosilada puede alterarse a una S. Así, se contemplan las alteraciones S67T y S44T (con respecto a SEQ ID NO: 1). Asimismo, en una variante A24N, puede utilizarse una alteración S26T. En consecuencia, un polipéptido de ActRIIB de la presente divulgación puede ser una variante que tenga una o más secuencias consenso de glucosilación N-enlazadas adicionales, no endógenas, como se ha descrito anteriormente.

En determinadas realizaciones, la divulgación se refiere a antagonistas de ActRIIB que comprenden al menos un polipéptido de ActRIIB, que incluye fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas de los mismos. Preferentemente, los polipéptidos de ActRIIB para su uso de acuerdo con la divulgación son solubles (por ejemplo, un dominio extracelular de ActRIIB). En algunas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB para su uso de acuerdo con la divulgación inhiben (antagonizan) la actividad (por ejemplo, la transducción de señales de Smad) de uno o más ligandos de la superfamilia de TGF-beta [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3 y/o BMP10]. En algunas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB para su uso de acuerdo con la divulgación se unen a uno o más ligandos de la superfamilia de TGF-beta [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP10 y/o BMP9]. En algunas realizaciones, el polipéptido de ActRIIB de la divulgación comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una porción de ActRIIB que comienza en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 (por ejemplo, que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de SEQ ID NO: 1 y que termina en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134 (por ejemplo, que termina en cualquiera de los aminoácidos 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1, en la que la posición correspondiente a L79 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido (aminoácidos ácidos naturales D y E o un aminoácido ácido artificial). En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1, en la que la posición correspondiente a L79 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido

ácido. En algunas realizaciones, el polipéptido de ActRIIB de la divulgación comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54 y 58. En algunas realizaciones, el polipéptido de ActRIIB de la divulgación comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54 y 58, en la que la posición correspondiente a L79 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido. En algunas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación comprenden al menos un polipéptido de ActRIIB en el que la posición correspondiente a L79 de SEQ ID NO: 1 no es un aminoácido ácido (es decir, no es un aminoácido ácido D o E natural o un residuo de aminoácido ácido artificial).

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a polipéptidos trampa de GDF (también denominados "trampas de GDF"). En algunas realizaciones, las trampas de GDF de la presente divulgación son polipéptidos de ActRIIB variantes que comprenden una o más mutaciones (por ejemplo, adiciones, delecciones y sustituciones de aminoácidos y combinaciones de las mismas) en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión al ligando) de un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, un polipéptido ActRII "de tipo salvaje" o no modificado) de tal manera que el polipéptido de ActRIIB variante tiene una o más actividades de unión al ligando alteradas con respecto al polipéptido de ActRIIB de tipo salvaje correspondiente. En realizaciones preferidas, los polipéptidos trampa de GDF de la presente divulgación conservan al menos una actividad similar a la de un polipéptido de ActRIIB de tipo salvaje correspondiente. Por ejemplo, las trampas de GDF preferibles se unen e inhiben (por ejemplo, antagonizan) la función de GDF11 y/o GDF8. En algunas realizaciones, las trampas de GDF de la presente divulgación además se unen e inhiben uno o más de los ligandos de la superfamilia de TGF-beta. En consecuencia, la presente divulgación proporciona polipéptidos trampa de GDF que tienen una especificidad de unión alterada por uno o más ligandos de ActRIIB.

A modo de ejemplo, pueden seleccionarse una o más mutaciones que aumenten la selectividad del dominio de unión al ligando alterado para GDF11 y/o GDF8 frente a uno o más ligandos de unión a ActRIIB, tales como activinas (activina A, activina B, activina AB, activina C y/o activina E), en especial la activina A. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene un cociente entre la K_d para la unión a activina y la K_d para la unión a GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces mayor en relación con el cociente para el dominio de unión al ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene un cociente entre la CI_{50} para inhibir la activina y la CI_{50} para inhibir el GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces mayor en relación con el dominio de unión al ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe GDF11 y/o GDF8 con una CI_{50} al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces menor que la CI_{50} para inhibir la activina (por ejemplo, activina A).

En determinadas realizaciones preferidas, las trampas de GDF de la presente divulgación están diseñadas para unirse preferentemente a GDF11 y/o GDF8 (también conocido como miostatina). Opcionalmente, las trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 pueden unirse además a la activina B. Opcionalmente, las trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 pueden unirse además a BMP6. Opcionalmente, las trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 pueden unirse además a BMP10. Opcionalmente, las trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 pueden unirse además a la activina B y BMP6. En determinadas realizaciones, las trampas de GDF de la presente divulgación tienen afinidad de unión disminuida por las activinas (por ejemplo, activina A, activina A/B, activina B, activina C, activina E), por ejemplo, en comparación con un polipéptido de ActRIIB de tipo salvaje. En determinadas realizaciones preferidas, un polipéptido trampa de GDF de la presente divulgación tiene una afinidad de unión disminuida por la activina A.

Los residuos de aminoácidos de las proteínas ActRIIB (por ejemplo, E39, K55, Y60, K74, W78, L79, D80, y F101) se encuentran en el bolsillo de unión al ligando de ActRIIB y ayudan a mediar en la unión a sus ligandos, incluidos, por ejemplo, activina A, GDF11, y GDF8. Así, la presente divulgación proporciona polipéptidos trampa de GDF que comprenden un dominio de unión al ligando alterado (por ejemplo, un dominio de unión a GDF8/GDF11) de un receptor ActRIIB que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos.

Como ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión al ligando de ActRIIB puede mutarse a un residuo de aminoácido diferente para producir un polipéptido trampa de GDF que se une preferentemente a GDF8, pero no a la activina. Preferentemente, el residuo D80 con respecto a SEQ ID NO: 1 se cambia por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo formado por un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como ejemplo específico adicional, el residuo hidrófobo L79 de SEQ ID NO: 1 puede alterarse para conferir propiedades de unión a activina-GDF11/GDF8 alteradas. Por ejemplo, una sustitución L79P reduce la unión a GDF11 en mayor medida que la unión a activina. Por el contrario, la sustitución de L79 por un aminoácido ácido [un ácido aspártico o un ácido glutámico; una sustitución L79D o L79E] reduce en gran medida la afinidad de unión por la activina A, al tiempo que mantiene la afinidad de unión por GDF11. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizar un polipéptido trampa de GDF que es una variante del polipéptido de ActRIIB que comprende un aminoácido ácido (por ejemplo, D o E) en la posición

correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1, opcionalmente junto con una o más sustituciones, adiciones o deleciones adicionales de aminoácidos.

La presente divulgación contempla la preparación de variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido de ActRIIB para fines tales como la mejora de la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, la vida útil y la resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Las variantes pueden producirse por sustitución, delección, adición o combinación de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o una valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tenga un efecto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados con respecto a sus cadenas laterales. Puede determinarse con facilidad si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la divulgación da lugar a un homólogo funcional, mediante la evaluación de la capacidad del polipéptido variante para producir una respuesta en células de una manera similar al polipéptido de tipo salvaje, o para unirse a uno o más ligandos de TGF-beta, incluyendo, por ejemplo, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrófico derivado de células gliales ("glial cell-derived neurotrophic factor", GDNF), neurturina, artemina, persefina, MIS y Lefty.

La presente divulgación contempla mutaciones específicas de un polipéptido de ActRIIB para alterar la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como sitios de glucosilación O-enlazados o N-enlazados. Los sitios de reconocimiento de glucosilación enlazados a la asparagina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (en la que "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por las enzimas de glucosilación celulares adecuadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido (para sitios de glucosilación O-enlazados). Una diversidad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posición de aminoácido de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o la delección de un aminoácido en la segunda posición) da lugar a la no glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otra forma de aumentar el número de restos de carbohidrato en un polipéptido es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. En función del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres, como los de la cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos, como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. La eliminación de uno o más restos de carbohidrato presentes en un polipéptido puede realizarse química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición de un polipéptido al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento provoca 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 los restos de carbohidrato en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo- y exoglucosidasas descritas por Thotakura *et al.* [Meth. Enzymol. (1987), 138:350]. La secuencia de un polipéptido puede ajustarse, según convenga, en función del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y vegetales pueden introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos de la presente divulgación para su uso en seres humanos pueden expresarse en una línea celular de mamífero que proporcione una glucosilación adecuada, tales como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se prevé que también sean útiles otras líneas celulares de expresión de mamífero.

La presente divulgación contempla además un procedimiento de generación de mutantes, en especial conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido de ActRIIB, así como mutantes de truncamiento. Los conjuntos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de ActRIIB funcionalmente activas (por ejemplo, de unión al ligando de la superfamilia de TGF-beta). El objetivo del cribado de dichas bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos que tengan propiedades alteradas, tales como una farmacocinética alterada o una unión al ligando alterada. A continuación, se proporcionan diversos ensayos de cribado, que pueden utilizarse para evaluar las variantes. Por ejemplo, puede estudiarse la capacidad de las variantes de ActRIIB de unirse a uno o más ligandos de la superfamilia de TGF-beta (por ejemplo, BMP2/7, BMP3, BMP4/7, BMP5, BMP6/7, BMP8a, BMP8b, BMP9), BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, activina A, activina B, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), neurturina, artemina, persefina, MIS y Lefty), para impedir la unión de un ligando de la superfamilia de TGF-beta a un receptor de la superfamilia de TGF-beta y/o para interferir en la transducción de señales causada por un ligando de la superfamilia de TGF-beta.

La actividad de los polipéptidos de ActRIIB también puede ensayarse en un ensayo en células o *in vivo*. Por ejemplo, puede evaluarse el efecto de un polipéptido de ActRIIB en la expresión de genes implicados en la agudeza de la mielofibrosis. Esto puede realizarse, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas de ligando de ActRII recombinantes (por ejemplo, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9,

BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), neurturina, artemina, persefina, MIS y Lefty), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido de ActRIIB y, opcionalmente, un ligando de ActRIIB. Del mismo modo, puede administrarse un polipéptido de ActRIIB a un ratón u otro animal y pueden evaluarse los efectos sobre la mielofibrosis utilizando procedimientos reconocidos en la técnica. Del mismo modo, la actividad de un polipéptido de ActRIIB o de una variante del mismo puede ensayarse en células precursoras de células sanguíneas para detectar cualquier efecto sobre el crecimiento de estas células, por ejemplo, mediante los ensayos descritos en el presente documento y los de conocimiento común en la técnica. En estas líneas celulares puede utilizarse un gen indicador que responda a SMAD para controlar los efectos sobre la transducción de señales corriente abajo.

Pueden generarse variantes derivadas combinatoriamente que tengan una selectividad aumentada o una potencia en general aumentada en relación con un polipéptido de ActRIIB de referencia. Tales variantes, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, pueden utilizarse en protocolos de terapia génica. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes que el correspondiente polipéptido de ActRIIB no modificado. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse más o menos estable frente a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que provoquen la destrucción, o una inactivación de cualquier otro modo, de un polipéptido no modificado. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles del complejo polipeptídico modulando la semivida del polipéptido. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles del complejo polipeptídico recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión de Fc, pueden realizarse mutaciones en el conector (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida del polipéptido de ActRIIB.

Se puede producir un banco combinatorio mediante un banco degenerado de genes que codifican un banco de polipéptidos que incluyen cada uno al menos una parte de secuencias de ActRIIB potenciales. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente a secuencias génicas de forma que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos codificantes de ActRIIB puedan expresarse en forma de polipéptidos individuales o, como alternativa, en forma de un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la presentación por fagos).

Hay muchas maneras de generar el banco de homólogos potenciales a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de ADN, y los genes sintéticos pueden ligarse después a un vector adecuado para su expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica [Narang, S.A. (1983), *Tetrahedron*, 39:3; Itakura *et al.* (1981) *Recombinant DNA*, Proc. 3er Simposio de Cleveland, Macromolecules, ed. A.G. Walton, Ámsterdam, Elsevier, págs. 273-289; Itakura *et al.* (1984), *Annu. Rev. Biochem.*, 53:323; Itakura *et al.* (1984), *Science*, 198:1056; y Ike *et al.* (1983), *Nucleic Acid Res.*, 11:477]. Estas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas [Scott *et al.* (1990), *Science*, 249:386-390; Roberts *et al.* (1992), *PNAS USA*, 89:2429-2433; Devlin *et al.* (1990), *Science*, 249: 404-406; Cwirla *et al.* (1990), *PNAS USA*, 87: 6378-6382; así como las patentes de EE. UU. n.ºs 5 223 409, 5 198 346 y 5 096 815].

Como alternativa, pueden utilizarse otras formas de mutagénesis para generar un banco combinatorio. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación pueden generarse y aislarse a partir de un banco mediante cribado utilizando, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina [Ruf *et al.* (1994), *Biochemistry*, 33:1565-1572; Wang *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.*, 269:3095-3099; Balint *et al.* (1993), *Gene*, 137:109-118; Grodberg *et al.* (1993), *Eur. J. Biochem.*, 218:597-601; Nagashima *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.*, 268:2888-2892; Lowman *et al.* (1991), *Biochemistry*, 30:10832-10838; Cunningham *et al.* (1989), *Science*, 244:1081-1085], mediante mutagénesis de barrido de conectores [Gustin *et al.* (1993), *Virology*, 193:653-660; y Brown *et al.* (1992), *Mol. Cell Biol.*, 12:2644-2652; McKnight *et al.* (1982), *Science*, 232:316], por mutagénesis de saturación [Meyers *et al.*, (1986), *Science*, 232:613]; por mutagénesis con PCR [Leung *et al.* (1989), *Method Cell Mol. Biol.*, 1:11-19]; o por mutagénesis aleatoria, incluida la mutagénesis química [Miller *et al.* (1992), *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener *et al.* (1994), *Strategies in Mol. Biol.*, 7:32-34]. La mutagénesis de barrido de conectores, especialmente en un entorno combinatorio, es un procedimiento atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos de ActRIIB.

En la técnica se conoce una amplia gama de técnicas para el cribado de productos génicos de bancos combinatorios preparados mediante mutaciones puntuales y truncamientos y, para el caso, para el cribado de bancos de ADNc en busca de productos génicos que tengan una determinada propiedad. Dichas técnicas serán por lo general adaptables para el cribado rápido de los bancos de genes generados por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos de ActRIIB. Las técnicas más utilizadas para el cribado de grandes bancos de genes suelen comprender la clonación del banco de genes en vectores de expresión replicables, la transformación de las células adecuadas con el banco de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita un aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se ha detectado. Los ensayos preferidos incluyen el ligando de TGF-beta (por ejemplo, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15,

GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), neurturina, artemina, persefina, MIS y Lefty) y/o ensayos de transducción de señales celular mediada por ligando de TGF-beta.

Como reconocerá un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas en el presente documento pueden realizarse a nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccional o síntesis química. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica y algunas de ellas se describen en el presente documento. En parte, la presente divulgación identifica porciones funcionalmente activas (fragmentos) y variantes de polipéptidos de ActRIIB que pueden utilizarse como guía para generar y utilizar otras variantes de polipéptidos de ActRIIB dentro del alcance de las invenciones descritas en el presente documento.

Los fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos de ActRIIB de la presente divulgación pueden obtenerse seleccionando polipéptidos producidos de modo recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62). Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como la química convencional de f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield. Los fragmentos pueden producirse (de modo recombinante o por síntesis química) y ensayarse para identificar aquellos fragmentos peptídicos que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de los receptores ActRII y/o de uno o más ligandos (por ejemplo, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), neurturina, artemina, persefina, MIS y Lefty).

Los polipéptidos de ActRIIB de la presente divulgación pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté presente de forma natural en el polipéptido de ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, el polipéptido de ActRIIB puede contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, polisacáridos o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido trampa de ligando pueden ensayarse como se describe en el presente documento para otras variantes de ActRIIB. Cuando un polipéptido de la divulgación se produce en células por escisión de una forma naciente del polipéptido, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Diferentes células (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos de ActRII.

En determinados aspectos, los polipéptidos de ActRIIB de la presente divulgación incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción (dominio) de un polipéptido de ActRIIB y una o más porciones (dominios) heterólogas. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, entre otros, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S-transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), la proteína de unión a maltosa ("maltose binding protein", MBP) o la seroalbúmina humana. Un dominio de fusión puede seleccionarse para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son especialmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para la purificación por afinidad se utilizan matrices adecuadas para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de estas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) que es útil con compañeros de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección del polipéptido de ActRIIB. Algunos ejemplos de estos dominios de detección son las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como los "marcadores de epítipo", que suelen ser secuencias peptídicas cortas para las que se dispone de un anticuerpo específico. Entre los marcadores de epítipo más conocidos para los que existen anticuerpos monoclonales específicos se encuentran los marcadores FLAG, la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de corte de proteasa, tales como para el factor Xa o la trombina, que permite a la proteasa pertinente digerir parcialmente las proteínas de fusión y liberar así las proteínas recombinantes de fusión. A continuación, las proteínas liberadas pueden aislarse del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional) incluidos, por ejemplo, dominios constantes de inmunoglobulinas (por ejemplo, dominios Fc).

En determinados aspectos, los polipéptidos de ActRIIB de la presente divulgación contienen una o más modificaciones que son capaces de "estabilizar" los polipéptidos. Por "estabilizador" se entiende cualquier elemento que aumente la semivida *in vitro*, la semivida sérica, independientemente de si se debe a una disminución de la destrucción, a una disminución del aclaramiento renal o a otro efecto farmacocinético del agente. Por ejemplo, dichas modificaciones aumentan la vida útil de los polipéptidos, aumentan la semivida circulatoria de los polipéptidos y/o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, entre otras, proteínas de fusión (incluidas, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un dominio de polipéptido de ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluido, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido de la divulgación) y modificaciones de restos de carbohidrato (incluida, por ejemplo, la eliminación de

restos de carbohidrato de un polipéptido de la divulgación). Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, un dominio Fc de inmunoglobulina), como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas, tales como un resto de carbohidrato, o un resto no proteico, tal como el polietilenglicol. Un polipéptido de ActRIIB puede fusionarse con un dominio heterólogo que estabilice el polipéptido (un dominio "estabilizador"), preferentemente un dominio heterólogo que aumente la estabilidad del polipéptido *in vivo*. Se sabe que las fusiones con un dominio constante de una inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio Fc) confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones con seroalbúmina humana pueden conferir propiedades deseables.

A continuación se muestra un ejemplo de secuencia de aminoácidos nativa que puede utilizarse para la porción Fc de la IgG1 humana (G1Fc) (SEQ ID NO: 9). El subrayado discontinuo indica la región bisagra, y el subrayado continuo indica las posiciones con variantes naturales. En parte, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden, consisten fundamentalmente o consisten en secuencias de aminoácidos con un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con SEQ ID NO: 9. Las variantes naturales de G1Fc incluirían E134D y M136L según el sistema de numeración utilizado en SEQ ID NO: 9 (véase Uniprot P01857).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 9)

```

Opcionalmente, el dominio Fc de IgG1 tiene una o más mutaciones en residuos como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En determinados casos, el dominio Fc de IgG1 mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación de Asp-265) tiene una capacidad reducida de unión al receptor de Fcγ 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, la mutación de Asn-434) tiene una mayor capacidad de unión al receptor de Fc relacionado con el MHC de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc de IgG1 de tipo salvaje.

A continuación se muestra un ejemplo de secuencia de aminoácidos nativa que puede utilizarse para la porción Fc de la IgG2 humana (G2Fc) (SEQ ID NO: 10). El subrayado discontinuo indica la región bisagra y el subrayado doble indica las posiciones en las que hay conflictos de base de datos en la secuencia (según UniProt P01859). En parte, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden, consisten fundamentalmente o consisten en secuencias de aminoácidos con un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con SEQ ID NO: 10.

```

1  VECPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK (SEQ ID NO: 10)

```

A continuación se muestran dos ejemplos de secuencias de aminoácidos que pueden utilizarse para la porción Fc de la IgG3 humana (G3Fc). La región bisagra en G3Fc puede ser hasta cuatro veces más larga que en otras cadenas Fc y contiene tres segmentos idénticos de 15 residuos precedidos por un segmento similar de 17 residuos. La primera secuencia de G3Fc que se muestra a continuación (SEQ ID NO: 11) contiene una región bisagra corta formada por un único segmento de 15 residuos, mientras que la segunda secuencia de G3Fc (SEQ ID NO: 12) contiene una región bisagra de longitud completa. En cada caso, el subrayado discontinuo indica la región bisagra, y el subrayado continuo indica las posiciones con variantes naturales según UniProt P01859. En parte, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden, consisten fundamentalmente o consisten en secuencias de aminoácidos con un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con las SEQ ID NO: 11 y 12.

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSF LTVLHQDWLN
101 GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKTGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 11)

```

```

1  ELKTPLGDTT HTPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSFVLT LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO:

```

12)

- 5 Las variantes naturales de G3Fc (por ejemplo, véase Uniprot P01860) incluyen E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y cuando se convierten al sistema de numeración utilizado en SEQ ID NO: 11, y la presente divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden dominios G3Fc que contienen una o más de estas variaciones. Además, el gen de la inmunoglobulina humana IgG3 (*IGHG3*) muestra un polimorfismo estructural caracterizado por diferentes longitudes de bisagra [véase Uniprot P01859]. En concreto, la variante WIS carece de la mayor parte de la región V y de toda la región CH1. Tiene un enlace disulfuro intercatenario adicional en la posición 7, además de los 11 normalmente presentes en la región bisagra. La variante ZUC carece de la mayor parte de la región V, de toda la región CH1 y de parte de la bisagra. La variante OMM puede representar una forma alélica u otra subclase de cadena gamma. La presente divulgación proporciona proteínas de fusión adicionales que comprenden dominios G3Fc que contienen una o más de estas variantes.

- 15 A continuación se muestra un ejemplo de secuencia de aminoácidos nativa que puede utilizarse para la porción Fc de la IgG4 humana (G4Fc) (SEQ ID NO: 13). El subrayado discontinuo indica la región de bisagra. En parte, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden, consisten fundamentalmente o consisten en secuencias de aminoácidos con un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con SEQ ID NO: 13.

```

1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSFVLT LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 13)

```

- 20 En el presente documento se presenta una variedad de mutaciones introducidas en el dominio Fc con respecto a la secuencia de G1Fc (SEQ ID NO: 9), y pueden derivarse mutaciones análogas en G2Fc, G3Fc y G4Fc a partir de su alineación con G1Fc en la figura 11. Debido a las longitudes de bisagra desiguales, las posiciones de Fc análogas basadas en la alineación de isotipos (figura 11) poseen números de aminoácidos diferentes en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 y 13. También se puede apreciar que una posición de aminoácido determinada en una secuencia de
- 25 inmunoglobulina formada por regiones bisagra, CH₂ y CH₃ (por ejemplo, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 y 13) se identificará con un número diferente al de la misma posición cuando la numeración abarque todo el dominio constante de cadena pesada de IgG1 (que consiste en las regiones CH₁, bisagra, CH₂ y CH₃), como en la base de datos Uniprot. Por ejemplo, la correspondencia entre posiciones de CH₃ seleccionadas en una secuencia de G1Fc humana (SEQ ID NO: 9), el dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana (Uniprot P01857) y la cadena pesada de IgG1 humana es la siguiente.
- 30

Correspondencia de las posiciones de CH ₃ en diferentes sistemas de numeración		
G1Fc (La numeración comienza en la primera treonina de la región bisagra)	Dominio constante de cadena pesada de IgG1 (la numeración comienza en CH ₁)	Cadena pesada DE IgG1 (esquema de numeración Eu de Kabat <i>et al.</i> , 1991*)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
* Kabat <i>et al.</i> (eds.), 1991, págs. 688-696, en <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5ª ed., vol. 1, NIH, Bethesda, MD.		

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de Fc de inmunoglobulina) pueden disponerse de cualquier manera que sea coherente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un dominio de polipéptido de ActRIIB puede situarse C-terminal a un dominio heterólogo, o como alternativa, un dominio heterólogo puede situarse C-terminal a un dominio de polipéptido de ActRIIB. El dominio de polipéptido de ActRIIB y el dominio heterólogo no tienen por qué ser adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales C- o N-terminales a cualquiera de los dominios o entre los dominios.

Por ejemplo, una proteína de fusión del receptor de ActRIIB puede comprender una secuencia de aminoácidos según se establece en la fórmula A-B-C. La porción B corresponde a un dominio de polipéptido de ActRIIB. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y tanto las porciones A como C, cuando están presentes, son heterólogas a B. Las porciones A y/o C pueden estar unidas a la porción B mediante una secuencia conectora. Un conector puede ser rico en glicina (por ejemplo, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de glicina) o residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una secuencia única de treonina/serina y glicinas o secuencias repetidas de treonina/serina y/o glicinas, por ejemplo, singuletes de GGG (SEQ ID NO: 14), GGGG (SEQ ID NO: 15), TGGGG (SEQ ID NO: 16), SGGGG (SEQ ID NO: 17), TGGG (SEQ ID NO: 18), SGGG (SEQ ID NO: 19), o GGGGS (SEQ ID NO: 20), o repeticiones. Una proteína de fusión de ActRIIB puede comprender una secuencia de aminoácidos según la fórmula A-B-C, en la que A es una secuencia líder (señal), B consiste en un dominio de polipéptido de ActRIIB y C es una porción polipeptídica que mejora una o más de las siguientes características: estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos de proteínas y/o purificación. Una proteína de fusión de ActRIIB puede comprender una secuencia de aminoácidos según la fórmula A-B-C, en la que A es una secuencia líder TPA, B consiste en un dominio del polipéptido del receptor ActRIIB y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión preferidas comprenden la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 24, 25, 28, 29, 31, 33, 34, 45, 50, 53 y 58.

Los polipéptidos de ActRIIB que se utilizarán de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser polipéptidos aislados. Tal como se utiliza en el presente documento, una proteína o polipéptido aislado es aquel que ha sido separado de un componente de su entorno natural. Un polipéptido de la divulgación puede purificarse con una pureza superior al 95 %, al 96 %, al 97 %, al 98 % o al 99 % determinada, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico ("isoelectric focusing", IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Flatman *et al.* (2007), J. Chromatogr. B

848:79-87]. Los polipéptidos de ActRIIB que se utilizarán de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento son polipéptidos recombinantes.

Los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación pueden producirse mediante una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, los polipéptidos de la divulgación pueden sintetizarse utilizando técnicas convencionales de química de proteínas como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, existen en el mercado sintetizadores automatizados de péptidos (por ejemplo, Advanced ChemTech modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). Como alternativa, los polipéptidos de la divulgación, incluidos los fragmentos o variantes de los mismos, pueden producirse de modo recombinante utilizando diversos sistemas de expresión [por ejemplo, *E. coli*, células de ovario de hámster chino ("Chinese Hamster Ovary", CHO), células COS, baculovirus] como es bien conocido en la técnica. Los polipéptidos modificados o no modificados de la divulgación pueden producirse por digestión de polipéptidos de ActRIIB de longitud completa producidos de modo recombinante utilizando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o la enzima convertidora de aminoácidos básicos apareados ("paired basic amino acid converting enzyme", PACE). Puede utilizarse un análisis informático (utilizando programas informáticos disponibles en el mercado, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar los sitios de escisión proteolítica. Como alternativa, dichos polipéptidos pueden producirse a partir de polipéptidos de ActRIIB de longitud completa generados de modo recombinante mediante escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina, etc.).

B. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de ActRIIB

También se proporcionan, pero no se reivindican, ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican los polipéptidos de ActRIIB (incluidos fragmentos, variantes funcionales (por ejemplo, trampas de GDF) y proteínas de fusión de los mismos). Por ejemplo, SEQ ID NO: 7 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB humana natural (la variante R64 descrita anteriormente), mientras que SEQ ID NO: 8 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIB (la variante R64 descrita anteriormente). Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden utilizarse, por ejemplo, en procedimientos para preparar polipéptidos trampa de ligando basados en ActRII como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica diferente de su localización cromosómica natural.

Puede entenderse que los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de ActRIIB de la divulgación incluyen ácidos nucleicos que son variantes de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, incluidas las variantes alélicas, y por lo tanto, incluirán una secuencia codificante que difiere de la secuencia de nucleótidos indicada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62.

Los polipéptidos de ActRIIB de la divulgación pueden estar codificados por secuencias de ácido nucleico aisladas y/o recombinantes que son al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idénticas a cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62. Un experto en la materia apreciará que las secuencias de ácido nucleico que son al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las secuencias complementarias con las SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62, y sus variantes, también están dentro del alcance de la presente divulgación. Las secuencias de ácido nucleico de la divulgación pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en un banco de ADN.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación también pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente rigurosas con la secuencia de nucleótidos indicada en las SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62, secuencias complementarias de las SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62, o sus fragmentos. Como se ha comentado anteriormente, una persona con conocimientos ordinarios en la materia comprenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de rigurosidad adecuadas que facilitan la hibridación del ADN. Un experto en la materia comprenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de rigurosidad adecuadas que facilitan 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 puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se modifica

la otra variable. La divulgación puede proporcionar 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.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos establecidos en SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 y 62 a debido a la degeneración del código genético también se encuentran dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, algunos aminoácidos se indican con más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos en la secuencia de ADN que provoquen cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión entre las células de mamífero. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína concreta pueden existir entre individuos de una especie determinada debido a la variación alélica natural. Todas y cada una de estas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta divulgación.

Los ácidos nucleicos recombinantes de la presente divulgación pueden unirse operativamente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias nucleotídicas reguladoras serán generalmente adecuadas para la célula hospedadora utilizada para la expresión. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión adecuados y secuencias reguladoras adecuadas, que pueden utilizarse en una gran variedad de células hospedadoras. Generalmente, una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, entre otras, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación traduccional, y secuencias potenciadoras o activadoras. La divulgación contempla promotores constitutivos o inducibles conocidos en la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En algunas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y pueden variar según la célula hospedadora utilizada.

El ácido nucleico en cuestión puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ActRIIB y unida operativamente al menos a una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de ActRIIB. Por consiguiente, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen ejemplos de secuencias reguladoras en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando están operativamente unidas a ella pueden utilizarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ActRIIB. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40, el promotor *tet*, el promotor temprano inmediato del adenovirus o del citomegalovirus, los promotores del RSV, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura, el promotor poliedro del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de las mismas. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también debe tenerse en cuenta el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores de antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante de la presente divulgación puede producirse ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, células aviares, de insecto o de mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los siguientes tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, tal como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Como alternativa, pueden utilizarse derivados de virus, tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivados de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células

eucariotas. Más adelante, en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica, aparecen ejemplos de otros sistemas de expresión vírica (incluidos los retrovíricos). Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de los organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados, tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos generales de recombinación, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Algunos ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tal como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tal como el pBlueBac III que contiene β -gal).

Puede diseñarse un vector para la producción de los polipéptidos de ActRIIB en cuestión en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como resultará evidente, las construcciones génicas en cuestión pueden utilizarse para provocar la expresión de los polipéptidos de ActRII en cuestión en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para su purificación.

La presente divulgación también se refiere a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante para uno o más de los polipéptidos de ActRIIB en cuestión. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB de la divulgación puede expresarse en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levaduras o células de mamífero [por ejemplo, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO)]. Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas.

En consecuencia, la presente divulgación se refiere además a procedimientos de producción de los polipéptidos de ActRIIB en cuestión. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRIIB puede cultivarse en condiciones adecuadas para permitir la expresión del polipéptido de ActRIIB. El polipéptido puede secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contenga el polipéptido. Como alternativa, el polipéptido de ActRIIB puede retenerse en el citoplasma o en una fracción de membrana y las células pueden recogerse, lisarse y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos en cuestión pueden aislarse del medio de cultivo celular, de las células hospedadoras, o de ambos, utilizando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmovinoafinidad 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, una columna de proteína A puede utilizarse para purificar una proteína de fusión de ActRIIB-Fc). El polipéptido de ActRIIB puede ser una proteína de fusión que contenga un dominio que facilite su purificación.

La purificación puede lograrse mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluidas, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Sepharose Q, cromatografía de fenilSepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón. Una proteína ActRIIB puede purificarse con una pureza >90 %, >95 %, >96 %, >98 % o >99 % determinada por cromatografía de exclusión por tamaño y >90 %, >95 %, >96 %, >98 % o >99 % determinada por SDS PAGE. El nivel de pureza diana debe ser suficiente para lograr resultados deseables en sistemas de mamíferos, en especial primates no humanos, roedores (ratones) y seres humanos.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de corte poli-(His)/enterocinasa en el 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 utilizando una resina metálica de Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación puede eliminarse posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para obtener el polipéptido de ActRIIB purificado. Véase, por ejemplo, Hochuli *et al.* (1987), *J. Chromatography*, 411:177; y Janknecht *et al.* (1991), *PNAS USA*, 88:8972.

Las técnicas para crear genes de fusión son bien conocidas. Fundamentalmente, la unión de diferentes fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con las técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos adecuados, relleno de los extremos cohesivos según proceda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligamiento enzimático. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, que incluyen los sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por PCR de los fragmentos génicos puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que den lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que puedan ser posteriormente hibridados para generar una secuencia génica quimérica. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons, 1992.

C. Antagonistas de anticuerpos

En determinados aspectos, no abarcados por la invención reivindicada, un antagonista de ActRIIB que se va a utilizar de acuerdo con el procedimiento y usos divulgados en el presente documento es un anticuerpo (anticuerpo antagonista de ActRIIB), o combinación de anticuerpos. Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse, por ejemplo, a uno o más ligandos de unión de ActRIIB (por ejemplo, activina, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 y BMP6), receptor de ActRIIB, receptor de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o correceptor de ActRIIB. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse solos o junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos para tratar la mielofibrosis, en concreto tratar o prevenir una o más complicaciones de la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis) y/o un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos la activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE). Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a la activina. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo contra la activina (o anticuerpo antiactivina) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a la activina con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a la activina. El grado de unión de un anticuerpo de activina a una proteína no relacionada con la activina puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a la activina medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo de activina puede unirse a un epítipo de la activina que se conserva entre activinas de diferentes especies. Un anticuerpo antiactivina puede unirse a la activina humana. Un anticuerpo contra la activina puede inhibir la unión de la activina a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por la activina (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo de activina puede inhibir la unión de la activina a un correceptor de ActRIIB y, por tanto, inhibir la transducción de señales mediada por la activina (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Cabe señalar que la activina A tiene una homología de secuencia similar a la activina B y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a la activina A, en algunos casos, también pueden unirse y/o inhibir la activina B, lo que también se aplica a los anticuerpos antiactivina B. También se divulga, pero no está cubierto por la invención reivindicada, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a la activina y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 y BMP6], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a la activina puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la BMP9 (por ejemplo, se une a la BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a la activina puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a la activina A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). También se divulgan, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo de activina y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos adicionales de la superfamilia de ActRIIB [por ejemplo, GDF8, GDF11, GDF3 y BMP6], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo de activina puede no comprender un anticuerpo de BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo de activina puede no comprender un anticuerpo de activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhibe al menos la activina B. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a la activina B. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo de activina B (o anticuerpo antiactivina B) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a la activina B con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a la activina B. El grado de unión de un anticuerpo de activina B a una proteína no relacionada con la activina B puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a la activina medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo de la activina B puede unirse a un epítipo de la activina B que se conserva entre la activina B de diferentes especies. Un anticuerpo antiactivina B puede unirse a la activina B humana. Un anticuerpo antiactivina B puede inhibir la unión de la activina B a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por la activina B (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo contra la activina B puede inhibir la unión de la activina B a un correceptor y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por la activina B (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Debe tenerse en cuenta que la activina B tiene una homología de secuencia similar a la activina A y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a la activina B, en algunos casos, también pueden unirse y/o inhibir la activina A. También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a activina B y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 y BMP6], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a la activina B puede no unirse o puede no unirse

sustancialmente a la BMP9 (por ejemplo, se une a la BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a la activina B puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a la activina A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). En el presente documento también se describen, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo de activina B y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6 y BMP10], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo de activina B puede no comprender un anticuerpo de BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo de activina B puede no comprender un anticuerpo de activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos GDF8. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a GDF8. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo GDF8 (o anticuerpo anti-GDF8) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a GDF8 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a GDF8. El grado de unión de un anticuerpo GDF8 a una proteína no relacionada con GDF8 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a GDF8 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo GDF8 puede unirse a un epítipo de GDF8 conservado entre GDF8 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-GDF8 puede unirse a GDF8 humano. Un anticuerpo contra GDF8 puede inhibir la unión de GDF8 a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por GDF8 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo contra GDF8 puede inhibir la unión de GDF8 a un correceptor y, por tanto, inhibir la transducción de señales mediada por GDF8 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Cabe señalar que GDF8 tiene una alta homología de secuencia con GDF 11 y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a GDF8, en algunos casos, también pueden unirse a y/o inhibir GDF11. También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a GDF8 y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF11, GDF3, BMP10 y BMP6], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a GDF8 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a BMP9 (por ejemplo, se une a BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a GDF8 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a activina la A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo GDF8 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10 y BMP15], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo GDF8 puede no comprender un anticuerpo BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo GDF8 puede no comprender un anticuerpo activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos GDF11. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a GDF 11. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo GDF 11 (o anticuerpo anti-GDF11) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a GDF11 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a GDF11. El grado de unión de un anticuerpo GDF 11 a una proteína no relacionada con GDF11 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a GDF 11 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo GDF11 puede unirse a un epítipo de GDF11 conservado entre GDF11 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-GDF 11 puede unirse a GDF11 humano. Un anticuerpo contra GDF11 puede inhibir la unión de GDF11 a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por GDF11 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo contra GDF11 puede inhibir la unión de GDF11 a un correceptor y, por tanto, inhibir la transducción de señales mediada por GDF11 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Cabe señalar que GDF 11 tiene una alta homología de secuencia con GDF8 y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a GDF11, en algunos casos, también pueden unirse a y/o inhibir GDF8. En el presente documento también se describe, pero no se reivindica, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a GDF 11 y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF3, BMP10 y BMP6], uno o más receptores de tipo I y/o receptores

de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a GDF 11 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a BMP9 (por ejemplo, se une a BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a GDF 11 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a activina la A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo GDF11 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF3, BMP6 y BMP10], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo GDF11 puede no comprender un anticuerpo BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo GDF11 puede no comprender un anticuerpo activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos BMP6. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a BMP6. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo BMP6 (o anticuerpo anti-BMP6) se refiere generalmente a un anticuerpo que puede unirse a BMP6 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a BMP6. El grado de unión de un anticuerpo BMP6 a una proteína no relacionada con BMP6 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a BMP6 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo BMP6 puede unirse a un epítipo de BMP6 conservado entre BMP6 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-BMP6 puede unirse a BMP6 humano. Un anticuerpo de BMP6 puede inhibir la unión de BMP6 a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por BMP6 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo de BMP6 puede inhibir la unión de BMP6 a un correceptor y, por lo tanto, inhibir la transducción de señales mediada por BMP6 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a BMP6 y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF3, BMP10 y GDF11], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a BMP6 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a BMP9 (por ejemplo, se une a BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a BMP6 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a activina la A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo BMP6 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF11, GDF3 y BMP10], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo BMP6 puede no comprender un anticuerpo BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo BMP6 puede no comprender un anticuerpo activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos GDF3. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a GDF3. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo GDF3 (o anticuerpo anti-GDF3) se refiere generalmente a un anticuerpo que puede unirse a GDF3 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a GDF3. El grado de unión de un anticuerpo GDF3 a una proteína no relacionada con GDF3 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a GDF3 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo GDF3 puede unirse a un epítipo de GDF3 conservado entre GDF3 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-GDF3 puede unirse a GDF3 humano. Un anticuerpo contra GDF3 puede inhibir la unión de GDF3 a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por GDF3 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo contra GDF3 puede inhibir la unión de GDF3 a un correceptor y, por tanto, inhibir la transducción de señales mediada por GDF3 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a GDF3 y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, BMP6, BMP10 y GDF11], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a GDF3 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente

a BMP9 (por ejemplo, se une a BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a GDF3 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a activina la A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo GDF3 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF11, BMP6 y BMP10], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo GDF3 puede no comprender un anticuerpo BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo GDF3 puede no comprender un anticuerpo activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos BMP10. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a BMP 10. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo BMP 10 (o anticuerpo anti-BMP10) se refiere generalmente a un anticuerpo que puede unirse a BMP10 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a BMP10. El grado de unión de un anticuerpo BMP10 a una proteína no relacionada con BMP10 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a BMP10 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción de proteínas o de afinidad de unión. Un anticuerpo BMP10 puede unirse a un epítipo de BMP10 conservado entre BMP10 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-BMP10 puede unirse a BMP10 humano. Un anticuerpo de BMP10 puede inhibir la unión de BMP10 a un receptor de tipo I y/o de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y, de este modo, inhibir la transducción de señales mediada por BMP10 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Un anticuerpo de BMP10 puede inhibir la unión de BMP10 a un correceptor y, por tanto, inhibir la transducción de señales mediada por BMP10 (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y usos del mismo, que se une a BMP10 y además se une, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), GDF8, GDF11, GDF3 y BMP6], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Un anticuerpo multiespecífico que se une a BMP10 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a BMP9 (por ejemplo, se une a BMP9 con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). Un anticuerpo multiespecífico que se une a BMP10 puede no unirse o puede no unirse sustancialmente a la activina A (por ejemplo, se une a activina la A con una K_D superior a 1×10^{-7} M o presenta una unión relativamente modesta, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o aproximadamente 1×10^{-9} M). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo BMP10 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más ligandos de ActRIIB adicionales [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), GDF8, GDF3 BMP6, BMP10 y GDF11], uno o más receptores de tipo I y/o receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o uno o más correceptores. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo BMP10 puede no comprender un anticuerpo BMP9. Una combinación de anticuerpos que comprenda un anticuerpo BMP10 puede no comprender un anticuerpo activina A.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos ActRIIB. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a ActRIIB. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo ActRIIB (anticuerpo anti-ActRIIB) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a ActRIIB con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a ActRIIB. El grado de unión de un anticuerpo anti-ActRIIB a una proteína no relacionada con ActRIIB puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a ActRIIB medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción proteína-proteína o de afinidad de unión. Un anticuerpo anti-ActRIIB puede unirse a un epítipo de ActRIIB conservado entre ActRIIB de diferentes especies. Un anticuerpo anti-ActRIIB puede unirse a ActRIIB humano. Un anticuerpo anti-ActRIIB puede inhibir la unión de ActRIIB a uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), GDF11, BMP6, GDF3 y BMP10]. Un anticuerpo anti-ActRIIB puede ser un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) que se une a ActRIIB y a uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC), GDF3, BMP6 y BMP10], receptor de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), correceptor y/o un receptor de tipo II adicional (por ejemplo, ActRIIA). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo anti-ActRIIB y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más de ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), BMP6, GDF3 y BMP10], correceptores, receptores de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7) y/o receptores de tipo II adicionales (por ejemplo, ActRIIA). Debe tenerse

en cuenta que ActRIIB tiene una secuencia similar a ActRIIA y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a ActRIIB, en algunos casos, también pueden unirse y/o inhibir ActRIIA.

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos ALK4. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a ALK4. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo ALK4 (anticuerpo anti-ALK4) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a ALK4 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a ALK4. El grado de unión de un anticuerpo anti-ALK4 a una proteína no relacionada con ALK4 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a ALK4 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción proteína-proteína o de afinidad de unión. Un anticuerpo anti-ALK4 puede unirse a un epítipo de ALK4 conservado entre ALK4 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-ALK4 puede unirse a ALK4 humano. Un anticuerpo anti-ALK4 puede inhibir la unión de ALK4 A uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), GDF11, BMP6, GDF3 y BMP10]. Un anticuerpo anti-ALK4 puede ser un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) que se une a ALK4 y a uno o más ligandos de GDF/BMP [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC), GDF3, BMP6 y BMP10], receptor de tipo II (por ejemplo, ActRIIB), correceptor y/o un receptor de tipo I adicional (por ejemplo, ALK5 y/o ALK7). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo anti-ALK4 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más de ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), BMP6 y BMP10], correceptores, receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB) y/o receptores de tipo I adicionales (por ejemplo, ALK5 y/o ALK7).

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos ALK5. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a ALK5. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo ALK5 (anticuerpo anti-ALK5) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a ALK5 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a ALK5. El grado de unión de un anticuerpo anti-ALK5 a una proteína no relacionada con ALK5 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a ALK5 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción proteína-proteína o de afinidad de unión. Un anticuerpo anti-ALK5 puede unirse a un epítipo de ALK5 conservado entre ALK5 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-ALK5 puede unirse a ALK5 humano. Un anticuerpo anti-ALK5 puede inhibir la unión de ALK5 A uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), GDF11, BMP6, GDF3 y BMP10]. Un anticuerpo anti-ALK5 puede ser un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) que se une a ALK5 y a uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC), GDF3, BMP6 y BMP10], receptor de tipo II (por ejemplo, ActRIIB), correceptor y/o un receptor de tipo I adicional (por ejemplo, ALK4 y/o ALK7). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo anti-ALK5 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más de ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), BMP6 y BMP10], correceptores, receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB) y/o receptores de tipo I adicionales (por ejemplo, ALK4 y/o ALK7).

Un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede ser un anticuerpo que inhiba al menos ALK7. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista de ActRIIB, o una combinación de anticuerpos, puede unirse al menos a ALK7. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo ALK7 (anticuerpo anti-ALK7) se refiere generalmente a un anticuerpo que se une a ALK7 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a ALK7. El grado de unión de un anticuerpo anti-ALK7 a una proteína no relacionada con ALK7 puede ser inferior a aproximadamente el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o inferior a aproximadamente el 1 % de la unión del anticuerpo a ALK7 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), Biacore u otro ensayo de interacción proteína-proteína o de afinidad de unión. Un anticuerpo anti-ALK7 puede unirse a un epítipo de ALK7 conservado entre ALK7 de diferentes especies. Un anticuerpo anti-ALK7 puede unirse a ALK7 humano. Un anticuerpo anti-ALK7 puede inhibir la unión de ALK7 A uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y activina BE), GDF11, BMP6, GDF3 y BMP10]. Un anticuerpo anti-ALK7 puede ser un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) que se une a ALK7 y a uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC), GDF3, BMP6 y BMP10], receptor de tipo II (por ejemplo, ActRIIB), correceptor y/o un receptor de tipo I adicional (por ejemplo, ALK4 y/o ALK5). También se describen en el presente documento, pero no se reivindican, combinaciones de anticuerpos, y usos de los mismos, en los que la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo anti-ALK7 y uno o más anticuerpos adicionales que se unen, por ejemplo, a uno o más de ligandos de ActRIIB [por ejemplo, GDF11, GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina

BC, activina AE y activina BE), BMP6 y BMP10], correceptores, receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB) y/o receptores de tipo I adicionales (por ejemplo, ALK4 y/o ALK5).

El término anticuerpo se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluidas, entre otras, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada. Un fragmento de anticuerpo se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocaténario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos [véase, por ejemplo, Hudson *et al.* (2003), Nat. Med., 9:129-134; Plückerthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); documento WO 93/16185; y patentes de EE. UU. n.ºs 5 571 894; 5 587 458 y 5 869 046]. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos [véase, por ejemplo, documento EP 404 097; documento WO 1993/01161; Hudson *et al.* (2003), Nat. Med., 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.* (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448]. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.* (2003), Nat. Med., 9:129-134. Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o parte del dominio variable de cadena pesada o todo o parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. Un anticuerpo de dominio único puede ser un anticuerpo humano de dominio único [véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6 248 516]. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos también divulgados en el presente documento, pero no reivindicados, pueden comprender un marcador unido a ellos y que pueda detectarse (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos aislados. Los anticuerpos pueden ser recombinantes.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase. La clase de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu.

En general, un anticuerpo para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento se une específicamente a su antígeno diana, preferentemente con alta afinidad de unión. La afinidad puede expresarse como un valor de K_D y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). Normalmente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, ya sea en un entorno sin células o asociado a células. Para obtener mediciones de la afinidad de unión puede utilizarse cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento, por ejemplo, Biacore, ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) y ELISA. Los anticuerpos pueden unirse a sus antígenos diana (por ejemplo, ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, GDF3, activina, GDF11, GDF8, BMP10 y/o BMP6) con al menos una K_D de 1 × 10⁻⁷ o más fuerte, 1 × 10⁻⁸ o más fuerte, 1 × 10⁻⁹ o más fuerte, 1 × 10⁻¹⁰ o más fuerte, 1 × 10⁻¹¹ o más fuerte, 1 × 10⁻¹² o más fuerte, 1 × 10⁻¹³ o más fuerte, o 1 × 10⁻¹⁴ o más fuerte.

La K_D puede medirse por RIA realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno diana como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno radiomarcado (por ejemplo, marcado con 125I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab [véase, por ejemplo, Chen *et al.* (1999), J. Mol. Biol., 293:865-881]. Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos (por ejemplo, MICROTITER® de Thermo Scientific) (por ejemplo, durante la noche) con un anticuerpo anti-Fab de captura (por ejemplo, de Cappel Labs) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina, preferentemente a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente, el antígeno radiomarcado se mezcla con diluciones seriadas de un Fab de interés [por ejemplo, en consonancia con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.* (1997), Cancer Res., 57:4593-4599]. A continuación, se incuba el Fab de interés, preferentemente durante la noche, pero la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación, preferentemente a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. A continuación, se retira la solución y se lava la placa varias veces, preferentemente con una mezcla de polisorbato 20 y PBS. Cuando las placas se han secado, se añade líquido de centelleo (por ejemplo, MICROSCINT® de Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma (por ejemplo, TOPCOUNT® de Packard).

Como alternativa, la K_D puede medirse mediante ensayos de resonancia de plasmón de superficie utilizando, por ejemplo, un BIACORE® 2000 o un BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) con chips CM5 de antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta ("response units", RU). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. Por ejemplo, un antígeno puede diluirse con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (aproximadamente 0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras

la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no reaccionan. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas dobles de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,05 % (PBST) a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las constantes de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calculan utilizando, por ejemplo, un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (K_D) se calcula como el cociente de k_{off}/k_{on} [véase, por ejemplo, Chen *et al.* (1999), J. Mol. Biol., 293:865-881]. Si la constante de activación supera, por ejemplo, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces la constante de activación puede determinarse utilizando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (por ejemplo, excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO® serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Los fragmentos de anticuerpo pueden fabricarse mediante diversas técnicas, incluidas, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, activina (activina A, activina B, activina C y activina E), GDF11, GDF8, BMP10, GDF3 y BMP6 humanas son conocidas en la técnica. Además, en la técnica se conocen numerosos procedimientos para generar anticuerpos, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por lo tanto, los antagonistas de anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden ser fabricados de la manera ordinaria por el experto en la materia basándose en los conocimientos de la técnica y en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie concreta, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente. Algunos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4 816 567; y Morrison *et al.* (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855. Un anticuerpo quimérico puede comprender una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. Un anticuerpo quimérico puede ser un anticuerpo "de clase cambiada", en el que la clase o subclase se ha modificado con respecto a la del anticuerpo original. En general, los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Un anticuerpo quimérico puede ser un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de regiones hipervariables ("hypervariable regions", HVR) no humanas y residuos de aminoácidos de regiones marco ("framework regions", FR) humanas. Un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente la totalidad o al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido humanizado. Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para fabricarlos se analizan, por ejemplo, en Almagro y Fransson (2008), Front. Biosci., 13:1619-1633 y se describen con más detalle, por ejemplo, en Riechmann *et al.* (1988), Nature, 332:323-329; Queen *et al.* (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033; patentes de EE. UU. n.ºs 5 821 337; 7 527 791; 6 982 321; y 7 087 409; Kashmiri *et al.* (2005), Methods, 36:25-34 [que describe el injerto de SDR (a-CDR)]; Padlan, Mol. Immunol., (1991), 28:489-498 [que describe el "rechapado"]; Dail'Acqua *et al.* (2005), Methods, 36:43-60 [que describe el "reordenamiento de FR"]; Osbourn *et al.* (2005), Methods, 36:61-68; y Klimka *et al.*, Br. J. Cancer (2000), 83:252-260 [que describe el enfoque de "selección guiada" del reordenamiento de FR]. Las regiones marco humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen, entre otras: regiones marco seleccionadas mediante el procedimiento de "mejor ajuste" [véase, por ejemplo, Sims *et al.* (1993), J. Immunol., 151:2296]; regiones marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de regiones variables de cadena ligera o pesada [véase, por ejemplo, Carter *et al.* (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; y Presta *et al.* (1993), J. Immunol., 151:2623]; regiones marco humanas maduras (somáticamente mutadas) o regiones marco de la línea germinal humana [véase, por ejemplo, Almagro y Fransson (2008), Front. Biosci., 13:1619-1633]; y regiones marco derivadas del cribado de bancos de FR [véase, por ejemplo, Baca *et al.* (1997), J. Biol. Chem., 272:10678-10684; y Rosok *et al.* (1996), J. Biol. Chem., 271:22611-22618].

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel (2008), Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-374 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol., 20:450-459. Por ejemplo, los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno (por ejemplo, un polipéptido de GDF11, un polipéptido de activina B, un polipéptido de ActRIIA o un polipéptido de ActRIIB) a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una provocación antigénica. Estos animales suelen contener todos o parte de los loci de inmunoglobulinas

humanas, que sustituyen a los loci de inmunoglobulinas endógenas, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En estos animales transgénicos, los loci de inmunoglobulinas endógenas suelen estar inactivados. Para un análisis de los procedimientos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase, por ejemplo, Lonberg (2005), *Nat. Biotech.*, 23:1117-1125; patentes de EE. UU. n.º 6 075 181 y 6 150 584 (que describen la tecnología XENOMOUSE™); patente de EE. UU. n.º 5 770 429 (que describe la tecnología HuMab®); patente de EE. UU. n.º 7 041 870 (que describe la tecnología K-M MOUSE®); y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0061900 (que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de los anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse aún más, por ejemplo, combinándolas con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos proporcionados en el presente documento también pueden fabricarse mediante procedimientos basados en hibridomas. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromioma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [véase, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.* (1984), 133: 3001; Brodeur *et al.* (1987), *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York; y Boerner *et al.* (1991), *J. Immunol.*, 147: 86]. Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología del hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.* (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562. Otros procedimientos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7 189 826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue (2006), 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología del hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein (2005), *Histol. Histopathol.*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein (2005), *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(3):185-191. Los anticuerpos humanos proporcionados en el presente documento también pueden generarse aislando secuencias de dominio variable de clones de Fv seleccionadas de bancos de presentación por fagos derivados de humanos. Estas secuencias de dominio variable pueden combinarse después con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de bancos de anticuerpos son conocidas en la técnica y se describen en el presente documento.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación pueden aislarse mediante el cribado de bancos combinatorios para detectar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. En la técnica se conocen diversos procedimientos para generar bibliotecas de visualización de fagos y cribar dichos bancos para detectar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Estos procedimientos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* (2001) en *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J. y se describen con más detalle, por ejemplo, en McCafferty *et al.* (1991), *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.* (1991), *Nature*, 352: 624-628; Marks *et al.* (1992), *J. Mol. Biol.*, 222:581-597; Marks y Bradbury (2003) en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu *et al.* (2004), *J. Mol. Biol.*, 338(2):299-310; Lee *et al.* (2004), *J. Mol. Biol.*, 340(5):1073-1093; Fellouse (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(34):12467-12472; y Lee *et al.* (2004), *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132.

En determinados procedimientos de presentación por fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa ("polymerase chain reaction", PCR) y se recombinan aleatoriamente en bancos de fagos, que luego pueden cribarse en busca de fagos de unión al antígeno como se describe en Winter *et al.* (1994), *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455. Los fagos suelen presentar fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Los bancos de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno (por ejemplo, ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, activina, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 o BMP6) sin necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin exponer puede clonarse (por ejemplo, a partir de humanos) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin inmunización, tal como describen Griffiths *et al.* (1993), *EMBO J.*, 12: 725-734. Por último, también se pueden preparar de modo sintético bancos sin exponer clonando segmentos del gen V no reordenados procedentes de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contengan secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, tal como describen Hoogenboom y Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388. Las publicaciones de patentes que describen bancos de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patente de EE. UU. n.º 5 750 373, y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos (normalmente anticuerpos monoclonales) tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis o más) en uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) antígenos.

Las técnicas para fabricar anticuerpos multiespecíficos incluyen, entre otras, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina con diferentes especificidades [véase, por ejemplo, Milstein y Cuello (1983), *Nature*, 305: 537; publicación de patente internacional n.º WO 93/08829; y Traunecker *et al.* (1991), *EMBO J.*, 10: 3655, y patente de EE. UU. n.º 5 731 168 (modificación de "botón en ojal" ["knob-in-hole"])]. Los anticuerpos multiespecíficos también pueden fabricarse mediante la modificación de efectos de

dirección electrostática para fabricar moléculas heterodiméricas-Fc de anticuerpo (véase, por ejemplo, documento WO 2009/089004A1); entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos [véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4 676 980; y Brennan *et al.* (1985), *Science*, 229: 81]; el uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos [véase, por ejemplo, Kostelny *et al.* (1992), *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553]; el uso de la tecnología de "diacuerpo" para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos [véase, por ejemplo, Hollinger *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448]; el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv) [véase, por ejemplo, Gruber *et al.* (1994), *J. Immunol.*, 152:5368]; y la preparación de anticuerpos trispecíficos (véase, por ejemplo, Tutt *et al.* (1991), *J. Immunol.*, 147: 60. Los anticuerpos multiespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpos. En el presente documento también se incluyen los anticuerpos modificados con tres o más sitios funcionales de unión al antígeno, incluidos los "anticuerpos Octopus" [véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1].

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contengan mutaciones naturales o que surjan durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando dichas variantes generalmente presentes en cantidades pequeñas. A diferencia de los preparados de anticuerpos policlonales, que suelen incluir diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal de un preparado de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único epítipo de un antígeno. Así, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse en el sentido de que requiera la producción del anticuerpo mediante un procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse de acuerdo con los presentes procedimientos pueden fabricarse mediante una diversidad de técnicas, incluidas, entre otras, el procedimiento del hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación por fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todo o parte de los loci de la inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento tales procedimientos y otros ejemplos de procedimientos para fabricar anticuerpos monoclonales.

Por ejemplo, utilizando inmunógenos derivados de la activina se pueden fabricar antisueros antiproteína/antipéptido o anticuerpos monoclonales mediante protocolos convencionales [véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed. por Harlow y Lane (1988), Cold Spring Harbor Press: 1988]. Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, puede inmunizarse con una forma inmunógena del polipéptido de activina, un fragmento antigénico 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. Una porción inmunogénica de un polipéptido de activina puede administrarse en presencia de un adyuvante. El avance de la inmunización puede controlarse mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Pueden utilizarse un ELISA convencional u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de producción de anticuerpos y/o el nivel de afinidad de unión.

Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de activina, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) pueden extraerse de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos convencionales de fusión de células somáticas con células inmortalizadoras, tales como células de mieloma, para producir células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma [véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975), *Nature*, 256: 495-497], la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos [véase, por ejemplo, Kozbar *et al.* (1983), *Immunology Today*, 4:72] y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96]. Las células de hibridoma pueden cribarse inmunológicamente para detectar la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de activina, y los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de un cultivo que comprenda dichas células de hibridoma.

Pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución, delección y/o adición) en una o más posiciones de aminoácidos.

Por ejemplo, la presente divulgación contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras [por ejemplo, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo ("antibody-dependent cellular cytotoxicity", ADCC)] son innecesarias o perjudiciales. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión al FcγR (por lo que probablemente carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión al Fcγn. Las principales células para la mediación de ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La

expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume, por ejemplo, en Ravetch y Kinet (1991), *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492. Algunos ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5 500 362; Hellstrom, I. *et al.* (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7059-7063; Hellstrom, I. *et al.* (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1499-1502; patente de EE. UU. n.º 5 821 337; Bruggemann, M. *et al.* (1987), *J. Exp. Med.*, 166:1351-1361. Como alternativa, pueden emplearse procedimientos de ensayo no radiactivos (por ejemplo, ACT1™, ensayo de citotoxicidad no radiactivo para citometría de flujo; CellTechnology, Inc. Mountain View, California; y CytoTox 96®, ensayo de citotoxicidad no radiactivo, Promega, Madison, Wisconsin). Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de sangre periférica ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) y los linfocitos citolíticos naturales ("natural killer", NK). Como alternativa, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el divulgado en Clynes *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:652-656. También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC [véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402]. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC [véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.* (1996), *J. Immunol. Methods*, 202:163; Cragg, M. S. *et al.* (2003), *Blood*, 101:1045-1052; y Cragg, M. S. y M. J. Glennie (2004), *Blood*, 103:2738-2743]. Las determinaciones de la unión a FcRn y del aclaramiento/semivida *in vivo* también pueden realizarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Petkova, S. B. *et al.* (2006), *Intl. Immunol.*, 18(12):1759-1769]. Los anticuerpos de la presente divulgación con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6 737 056). Tales mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el denominado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7 332 581).

Puede ser deseable crear anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. Los residuos sustituidos pueden encontrarse en lugares accesibles del anticuerpo. Al sustituir estos residuos por cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan en lugares accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunocójugado, como se describe más adelante. Cualquiera de los siguientes residuos puede sustituirse por cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos modificados con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7 521 541.

Además, las técnicas utilizadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se va a utilizar para unir un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión en solución. Existen diversas técnicas para ensayar las interacciones entre anticuerpos y antígenos con el fin de identificar anticuerpos especialmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de sándwich (por ejemplo, el sistema de esferas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

Se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos y/o los polipéptidos de unión. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo y/o polipéptido de unión. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo y/o polipéptidos de unión pueden prepararse introduciendo las modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo y/o polipéptido de unión, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo y/o del polipéptido de unión. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a la diana (por ejemplo, unión a activina, tal como unión a activina E y/o activina C).

Pueden realizarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden producirse en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que sufren mutaciones con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática [véase, por ejemplo, Chowdhury (2008), *Methods Mol. Biol.*, 207:179-196 (2008)] y/o SDR (a-CDR), ensayándose la afinidad de unión de la variante de VH o VL resultante. La maduración por afinidad mediante la construcción y reelección a partir de bancos secundarios se ha descrito en la técnica [véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, en *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)]. En algunos casos de maduración por afinidad, la diversidad puede introducirse en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una diversidad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a errores, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). A continuación, se crea un banco secundario. A continuación, se criba el banco para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad consiste en enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, de 4 a 6 residuos a la vez). Los residuos de HVR implicados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, mediante mutagénesis de barrido de alanina o modelización. Las CDR-H3 y CDR-L3, en concreto, suelen ser el objetivo.

Pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, en las HVR pueden realizarse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como las proporcionadas en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de HVR o SDR. En determinados casos de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones del anticuerpo y/o del polipéptido de unión que pueden ser objeto de mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como se describe en Cunningham y Wells (1989), Science, 244:1081-1085. En este procedimiento, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo-antígeno se ve afectada. Pueden introducirse más sustituciones en las ubicaciones de aminoácidos que muestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o además, se determina una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser seleccionados o eliminados como candidatos a la sustitución. Las variantes pueden cribarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales cuya longitud oscila entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de uno o varios residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo N-terminal de metionilo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

Un anticuerpo y/o polipéptido de unión puede modificarse aún más para que contenga elementos no proteínicos adicionales conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Las moléculas adecuadas para derivatizar el anticuerpo y/o el polipéptido de unión incluyen, entre otros, polímeros hidrosolubles. Algunos ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y sus mezclas. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo y/o al polipéptido de unión puede variar, y si hay más de un polímero unido, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en aspectos que incluyen, entre otros, las propiedades o funciones concretas del anticuerpo y/o polipéptido de unión a mejorar, y si el derivado del anticuerpo y/o derivado del polipéptido de unión se utilizará en un tratamiento en condiciones definidas.

D. Antagonistas de molécula pequeña

En otros aspectos no reivindicados, un antagonista de ActRIIB que se va a utilizar de acuerdo con los procedimientos y usos descritos en el presente documento puede ser una molécula pequeña (antagonistas de ActRIIB de molécula pequeña) o una combinación de antagonistas de molécula pequeña. Una antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir, por ejemplo, uno o más ligandos de ActRIIB (por ejemplo, activina, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6 y/o BMP10), un receptor de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), un receptor de tipo II (por ejemplo, ActRIIB) y/o un correceptor. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir la transducción de señales mediada por uno o más ligandos de ActRIIB, por ejemplo, como se determina en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Una antagonista de ActRIIB de molécula pequeña puede utilizarse solo o junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos, para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis, en concreto para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones asociadas a la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis y/o tratar a un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus).

Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos GDF11, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos GDF8, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF11, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos la activina (activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), y opcionalmente inhibe además uno

o más de GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos la activina B, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos BMP6, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos GDF3, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos BMP10, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos ActRIIB, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ALK4, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos ALK4, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, BMP10, ALK5 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos ALK5, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, BMP10 y ALK7. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir al menos ALK7, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 y BMP10. Un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, tal como se describe en el presente documento, puede no inhibir o puede no inhibir sustancialmente BMP9. Es posible que un antagonista de ActRIIB de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, no inhiba o no inhiba sustancialmente la activina A.

Los antagonistas de ActRIIB de molécula pequeña pueden ser inhibidores directos o indirectos. Por ejemplo, un antagonista indirecto de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir la expresión (por ejemplo, transcripción, traducción, secreción celular o combinaciones de las mismas) de al menos uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina B, activina BC, activina AE, o activina BE), GDF11, BMP10, BMP9, BMP6, BMP5, GDF3 y/o GDF8], receptor de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB), correceptor y/o uno o más componentes de la transducción de señales de ActRIIB corriente abajo (por ejemplo, Smads). Como alternativa, un antagonista directo de molécula pequeña, o combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede unirse directamente e inhibir, por ejemplo, uno o más uno o más ligandos de ActRIIB [por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina B, activina BC, activina AE, o activina BE), GDF11, BMP10, BMP9, BMP6, BMP5, GDF3 y/o GDF8], receptor de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB), correceptor y/o uno o más componentes de la transducción de señales de ActRIIB corriente abajo (por ejemplo, Smads). Pueden utilizarse combinaciones de uno o más antagonistas de ActRIIB de molécula pequeña indirectos y uno o más antagonistas de ActRIIB de molécula pequeña directos con los procedimientos descritos en el presente documento.

Los antagonistas de molécula pequeña de unión de la presente divulgación pueden identificarse y sintetizarse químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, publicaciones PCT n.^{os} WO 00/00823 y WO 00/39585). En general, los antagonistas de molécula pequeña de la divulgación suelen tener un tamaño inferior a aproximadamente 2000 daltons, como alternativa un tamaño inferior a aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons, en los que dichas moléculas orgánicas pequeñas son capaces de unirse, preferentemente de forma específica, a un polipéptido como se describe en el presente documento. Estos antagonistas de molécula pequeña pueden identificarse sin excesiva experimentación utilizando técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe señalar que las técnicas de cribado de bancos de moléculas pequeñas orgánicas para detectar moléculas capaces de unirse a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional n.^{os} WO00/00823 y WO00/39585).

Las moléculas pequeñas orgánicas de unión de la presente divulgación pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, aminoalcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazoicos y cloruros ácidos.

E. Antagonistas polinucleotídicos

En otros aspectos, un antagonista de ActRIIB que se va a utilizar de acuerdo con los procedimientos y usos divulgados en el presente documento es un polinucleótido (polinucleótido antagonista de ActRIIB), o combinación de polinucleótidos. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir, por ejemplo, uno o más ligandos de ActRIIB (por ejemplo, activina, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6 y/o BMP10), receptores de tipo I (por ejemplo, ALK4, ALK5 y/o ALK7), receptores de tipo II (por ejemplo, ActRIIB), correceptor y/o componente de la transducción de señales corriente abajo (por ejemplo, Smads). En algunas realizaciones, un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, inhibe la transducción de señales mediada por uno o más ligandos de ActRIIB, por ejemplo, como se determina en un ensayo en células como los descritos en el presente documento. Como se describe en el presente documento, los polinucleótidos antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse, solos o junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos, para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis, en concreto para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones asociadas a la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis) y/o tratar a un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus.

Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos GDF11, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos GDF8, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF11, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos la activina (activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos BMP6, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos GDF3, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos BMP10, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos ActRIIB, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ALK4, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de GDF/BMP, un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos ALK4, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, BMP10, ALK5 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos ALK5, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, BMP10 y ALK7. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede inhibir al menos ALK7, y opcionalmente inhibe además uno o más de GDF8, activina (por ejemplo, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE y/o activina BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 y BMP10. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede no inhibir o puede no inhibir sustancialmente BMP9. Un polinucleótido antagonista de ActRIIB, o una combinación de polinucleótidos antagonistas, puede no inhibir o puede no inhibir sustancialmente la activina A.

Los antagonistas polinucleotídicos pueden ser un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARNi [por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (miARN)], un aptámero y/o una ribozima. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina C y activina E), BMP6, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 y BMP10 humanas son conocidas en la técnica. Además, en la técnica se conocen muchos procedimientos diferentes para generar antagonistas polinucleotídicos. Por lo tanto, los antagonistas polinucleotídicos para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden ser fabricados de la forma ordinaria por el experto en la materia basándose en los conocimientos en la materia y las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Puede utilizarse la tecnología antisentido para controlar la expresión génica mediante ADN o ARN antisentido, o mediante la formación de una triple hélice. Las técnicas antisentido se analizan, por ejemplo, en Okano (1991), J. Neurochem., 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla.

(1988). La formación de triples hélices se analiza, por ejemplo, en, Cooney *et al.* (1988), Science, 241:456; y Dervan *et al.* (1991), Science, 251:1300. Los procedimientos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN complementario. Los ácidos nucleicos antisentido pueden comprender una secuencia de ARN o ADN monocatenario que sea complementaria con al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen descrito en el presente documento. Sin embargo, la complementariedad absoluta, aunque preferible, no es necesaria.

Una secuencia "complementaria con al menos una porción de un ARN", a la que se hace referencia en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para poder hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios de un gen divulgado en el presente documento, se puede ensayar así una sola cadena del ADN dúplex, o se puede ensayar la formación de triplex. La capacidad de hibridación dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Por lo general, cuanto mayor sea el ácido nucleico que se hibrida, más desapareamientos de bases con un ARN podrá contener y seguir formando un dúplex (o triplex, según el caso) estable. Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de desapareamiento utilizando procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los polinucleótidos que son complementarios con el extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia 5' no traducida hasta el codón de iniciación AUG y que incluye el mismo, deberían funcionar más eficientemente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, se ha demostrado que las secuencias complementarias con las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNm [véase, por ejemplo, Wagner, R. (1994), Nature, 372:333-335]. Así, los oligonucleótidos complementarios con las regiones no codificantes no traducidas 5' o 3' de un gen de la divulgación podrían utilizarse en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de un ARNm endógeno. Los polinucleótidos complementarios con la región 5' no traducida del ARNm deben incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los polinucleótidos antisentido complementarios con las regiones codificantes del ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción, pero podrían utilizarse de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación. Tanto si están diseñados para hibridarse con la región 5', 3' o codificante de un ARNm de la divulgación, los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud, y preferentemente son oligonucleótidos de entre 6 y aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido puede tener al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

El ácido nucleico antisentido puede producirse intracelularmente por transcripción a partir de una secuencia exógena. Por ejemplo, se transcribe un vector o una porción del mismo, produciendo un ácido nucleico (ARN) antisentido de un gen de la divulgación. Dicho vector contendría una secuencia que codificaría el ácido nucleico antisentido deseado. Un vector de este tipo puede permanecer episómico o integrarse cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Dichos vectores pueden construirse mediante procedimientos de tecnología de ADN recombinante habituales en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos u otros conocidos en la técnica, utilizados para la replicación y expresión en células de vertebrados. La expresión de la secuencia que codifica los genes deseados de la presente divulgación, o fragmentos de la misma, puede realizarse mediante cualquier promotor conocido en la técnica que actúe en células de vertebrados, preferentemente humanas. Estos promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Dichos promotores incluyen, entre otros, la región promotora temprana del SV40 [véase, por ejemplo, Benoist y Chambon (1981), Nature, 290:304-310], el promotor contenido en la repetición 3'-terminal larga del virus del sarcoma de Rous [véase, por ejemplo, Yamamoto *et al.* (1980), Cell, 22:787-797], el promotor de timidina del herpes [véase, por ejemplo, Wagner *et al.* (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:1441-1445] y las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína [véase, por ejemplo, Brinster, *et al.* (1982), Nature, 296:39-42].

Los antagonistas polinucleotídicos pueden ser moléculas de ARN interferente (ARNi) que se dirigen a la expresión de uno o más de: GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina C y activina E), BMP6, ActRIIB, GDF3, ALK4, ALK5, ALK7 y BMP10. El ARNi se refiere a la expresión de un ARN que interfiere con la expresión del ARNm diana. En concreto, el ARNi silencia un gen diana mediante la interacción con el ARNm específico a través de un ARNip (ARN interferente pequeño). A continuación, la célula degrada el complejo de ARN bc. Una molécula de ARNip es un dúplex de ARN bicatenario de 10 a 50 nucleótidos de longitud, que interfiere en la expresión de un gen diana que sea suficientemente complementario (por ejemplo, que tenga al menos un 80 % de identidad con el gen). La molécula de ARNip puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea al menos un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Otras moléculas de ARNi incluyen el ARN de horquilla corta (ARNhc); también la horquilla de interferencia corta y el microARN (miARN). La molécula de ARNhc contiene secuencias sentido y antisentido de un gen diana conectadas por un bucle. El ARNhc se transporta del núcleo al citoplasma y se degrada junto con el ARNm. Los promotores Pol III o U6 pueden utilizarse para expresar ARN para ARNi. Paddison *et al.* [Genes & Dev. (2002), 16:948-958, 2002] han utilizado moléculas de ARN pequeñas plegadas en horquillas como medio para afectar al ARNi. En consecuencia, dichas moléculas de ARN de horquilla corta (ARNhc) también se utilizan ventajosamente en los procedimientos descritos en el presente documento. La longitud de la estructura de tallo y bucle de los ARNhc funcionales varía; la longitud del tallo puede oscilar entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nt, y el tamaño del bucle puede variar entre 4 y aproximadamente 25 nt sin afectar a la actividad silenciadora. Sin querer ceñirse a ninguna teoría concreta, se cree que estos ARNhc se parecen a los productos de ARN bicatenarios (ARNbc) de la ARNasa DICER y,

en cualquier caso, tienen la misma capacidad para inhibir la expresión de un gen específico. El ARNhc puede expresarse a partir de un vector lentivírico. Un miARN es un ARN monocatenario de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos de longitud que se transcribe inicialmente como pre-miARN caracterizado por una estructura de "tallo-bucle", que posteriormente se procesa en miARN maduro tras un procesamiento posterior a través del RISC.

5 Las moléculas que median en elARNi, incluidas, entre otras, elARNip, pueden producirse *in vitro* por síntesis química (Hohjoh, FEBS Lett., 521:195-199, 2002), hidrólisis de ARNbc (Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947, 2002), por transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T7 (Donzeet *et al.*, Nucleic Acids Res., 30:e46, 2002; Yu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:6047-6052, 2002) y por hidrólisis de ARN bicatenario utilizando una nucleasa, tal como la ARNasa III de *E. coli* (Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947, 2002).

10 En el presente documento también se describen, pero no se reivindican, antagonistas polinucleotídicos que incluyen, entre otros, un ADN señuelo, un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, un ADN complejo, un ADN encapsulado, un ADN vírico, un ADN plasmídico, un ARN desnudo, un ARN encapsulado, un ARN vírico, un ARN bicatenario, una molécula capaz de generar ARN de interferencia, o combinaciones de los mismos.

15 Los antagonistas polinucleotídicos pueden ser aptámeros. Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico, incluidas moléculas de ADN bicatenario cadena y de ARN monocatenario, que se unen a una molécula diana y forman estructuras terciarias que se unen específicamente a la misma. La generación y el uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5 475 096). Se encontrará más información sobre los aptámeros en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060148748. Los aptámeros de ácido nucleico se seleccionan utilizando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el proceso de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment", SELEX). SELEX es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana, tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5 475 096; 5 580 737; 5 567 588; 5 707 796; 5 763 177; 6 011 577 y 6 699 843. Otro procedimiento de cribado para identificar aptámeros se describe en la patente de EE. UU. n.º 5 270 163. El proceso SELEX se basa en la capacidad de los ácidos nucleicos para formar una gran diversidad de estructuras bidimensionales y tridimensionales, así como en la versatilidad química disponible en los monómeros de nucleótidos para actuar como ligandos (formar pares de unión específica) con prácticamente cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico, incluidas otras moléculas de ácido nucleico y polipéptidos. Pueden actuar como dianas moléculas de cualquier tamaño o composición. El procedimiento SELEX implica la selección a partir de una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones paso a paso de unión, reparto y amplificación, utilizando el mismo esquema general de selección, para lograr la afinidad de unión y la selectividad deseadas. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, que puede comprender un segmento de secuencia aleatoria, el procedimiento SELEX incluye las etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión; separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a las moléculas diana; disociar los complejos de ácido nucleico-diana; amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana para obtener una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando. Las etapas de unión, reparto, disociación y amplificación se repiten a través de tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido nucleico que se unen con alta afinidad y especificidad a la molécula diana.

40 Generalmente, tales moléculas de unión se administran por separado al animal [véase, por ejemplo, O'Connor (1991), J. Neurochem., 56:560], pero tales moléculas de unión también pueden expresarse *in vivo* a partir de polinucleótidos captados por una célula hospedadora y expresados *in vivo* [véase, por ejemplo, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)].

F. Antagonistas de folistatina y FLRG

45 En otros aspectos no reivindicados, un antagonista de ActRIIB es un polipéptido de folistatina o FLRG. Como se describe en el presente documento, la folistatina y/o los polipéptidos de FLRG pueden utilizarse, solos o junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos, para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis, en concreto para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones asociadas a la mielofibrosis (por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis) y/o tratar a un paciente tratado con un inhibidor de la cinasa Janus.

50 La expresión "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de folistatina, así como sus variantes (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcional de folistatina. Los polipéptidos de folistatina pueden unirse y/o inhibir la actividad de la activina, en especial la activina A. Las variantes de los polipéptidos de folistatina que conservan las propiedades de unión a la activina pueden identificarse basándose en estudios anteriores sobre las interacciones entre la folistatina y la activina. Por ejemplo, el documento WO2008/030367 divulga dominios específicos de folistatina ("FSD") que han demostrado ser importantes para la unión a la activina. Como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 65-67, el dominio N-terminal de la folistatina ("FSND", SEQ ID NO: 65), FSD2 (SEQ ID NO: 67) y, en menor medida, FSD1 (SEQ ID NO: 66) representan ejemplos de dominios dentro de la folistatina que son importantes para la unión a la activina. Además, se han descrito anteriormente procedimientos para fabricar y ensayar bancos de polipéptidos en el contexto de los polipéptidos de ActRII, y tales

- 5 procedimientos también se refieren a crear y ensayar variantes de folistatina. Los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina, y opcionalmente al menos una identidad del 85 %, del 90 %, del 95 %, del 96 %, del 97 %, del 98 %, del 99 % o mayor. Algunos ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina madura o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de folistatina humana (SEQ ID NO: 63) como se describe, por ejemplo, en el documento WO2005/025601.

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

```

1  MVRARHOPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRIPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEDE DQDYSFPISS ILEW

```

(SEQ ID NO: 63; NCBI Reference No. NP_037541.1)

- 10 El péptido señal está subrayado; también están subrayados los últimos 27 residuos que representan la extensión C-terminal que distingue esta isoforma de folistatina de la isoforma de folistatina más corta FST317 mostrada a continuación.

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

```

1  MVRARHOPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG
RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101  GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR
NECALLKARC
151  KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRIPEPA
201  SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251  TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT
YASECAMKEA
301  ACSSGVLLEV KHSGSCN (SEQ ID NO: 64; NCBI Reference No. NP_006341.1)

```

- 15 El péptido señal está subrayado.

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

```

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN
TLFKWMI FNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 65; FSND)

```

Las secuencias FSD1 y FSD2 son las siguientes:

- 20 ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 66; FSD1)
KTCDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVT (SEQ ID NO: 67; FSD2)

- 25 En otros aspectos también descritos en el presente documento, pero no reivindicados, un agente para su uso de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento es un gen relacionado similar a la folistatina ("folistatin-like related gene", FLRG), también conocido como proteína 3 relacionada con la folistatina (FSTL3). La expresión "polipéptido de FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de FLRG, así como cualquier variante del mismo (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que

conservan una actividad útil. Los polipéptidos de FLRG pueden unirse a la activina y/o inhibir su actividad, en especial la activina A. Las variantes de los polipéptidos de FLRG que conservan las propiedades de unión a la activina pueden identificarse utilizando procedimientos ordinarios para ensayar las interacciones de FLRG y activina (véase, por ejemplo, el documento US 6 537 966). Además, los procedimientos para crear y ensayar bancos de polipéptidos se han descrito anteriormente en el contexto de los polipéptidos ActRII y dichos procedimientos también se aplican para crear y ensayar variantes de FLRG. Los polipéptidos de FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG, y opcionalmente una identidad al menos un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 99 % o mayor.

El polipéptido precursor de FLRG humano (precursor de la proteína 3 relacionada con la folistatina) es el siguiente:

1 MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGEVSSMGSG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL

51 VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD

101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECCELRA

10 151 ARCRGHPDLS VMYRGRCKRS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC

201 PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP

251 PGGESAEIEEE NFV (SEQ ID NO: 68; NCBI Reference No. NP_005851.1)

El péptido señal está subrayado.

Las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y polipéptidos de FLRG pueden incluir proteínas de fusión que tengan al menos una porción del polipéptido de folistatina o polipéptido de FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que faciliten el aislamiento, la detección, la estabilización o la multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se han tratado en detalle anteriormente con referencia a los polipéptidos de ActRIIB. En alguna realización, un agente antagonista de la divulgación es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de folistatina fusionado a un dominio Fc. En otra realización, un agente antagonista de la divulgación es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido FLRG fusionado a un dominio Fc.

3. Ensayos de cribado

En determinados aspectos también descritos en el presente documento, pero no reivindicados, la presente divulgación se refiere al uso de los polipéptidos de ActRIIB en cuestión y sus variantes (por ejemplo, trampas de GDF8) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos de ActRIIB. Los compuestos identificados mediante este cribado pueden probarse para evaluar su capacidad para tratar la mielofibrosis, por ejemplo, en modelos animales.

Existen numerosos enfoques para el cribado de agentes terapéuticos para tratar la mielofibrosis dirigiéndose a la transducción de señales de ActRIIB (por ejemplo, la transducción de señales de Smad). Se puede realizar un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturben los efectos mediados por ActRIIB en una línea celular seleccionada. El ensayo puede llevarse a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiban o reduzcan específicamente la unión de un polipéptido de ActRIIB a su compañero de unión, tal como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB, activina C, GDF8, GDF3, GDF11 o BMP10). Como alternativa, el ensayo puede utilizarse para identificar compuestos que potencien la unión de un polipéptido de ActRII a su compañero de unión, tal como un ligando de ActRIIB. Los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido de ActRIIB.

Una diversidad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente divulgación, aquellos no descritos expresamente en el presente documento serán, sin embargo, comprendidos por un experto en la materia. Como se describe en el presente documento, los compuestos de ensayo (agentes) de la invención pueden crearse mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. Como alternativa, los compuestos pueden ser biomoléculas naturales sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se van a ensayar para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), pueden ser producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos los peptidomiméticos) o pueden ser producidos de modo recombinante. Los compuestos de ensayo contemplados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de ensayo puede ser una molécula orgánica pequeña con un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 Daltons.

Los compuestos de ensayo de la divulgación pueden proporcionarse como entidades individuales y discretas, o proporcionarse en bancos de mayor complejidad, como los creados mediante química combinatoria. Estos bancos

pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, halogenuros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de cribado. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Algunos ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, esferas magnéticas, glutatión S-transferasa (GST), reticulantes fotoactivos o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos que ensayan bancos de compuestos y extractos naturales, los ensayos de alto rendimiento son deseables para maximizar el número de compuestos estudiados en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas sin células, como los que pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, suelen preferirse como cribados "primarios", ya que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de ensayo en general pueden soslayarse en el sistema *in vitro*, centrándose el ensayo principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular, manifestado como una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido de ActRIIB y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando de ActRIIB).

Simplemente para ilustrar, en un ejemplo de ensayo de cribado 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 de ActRIIB, según sea adecuado para la intención del ensayo. A la mezcla del compuesto y el polipéptido de ActRIIB se le añade entonces una composición que contiene un ligando de ActRIIB (por ejemplo, GDF11). La detección y cuantificación de complejos de ActRIIB/ligando de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, también puede realizarse un ensayo de control para obtener unos valores de referencia de comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade el ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido de ActRIIB, y se cuantifica la formación del complejo de ActRIIB/ligando de ActRIIB en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en que pueden mezclarse los reactivos puede variar y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden utilizarse extractos y lisados celulares para obtener un sistema de ensayo sin células adecuado.

La formación de complejos entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de modo detectable, tales como el polipéptido de ActRIIB y/o su proteína de unión marcado radiactivamente (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), con fluorescencia (por ejemplo, FITC) o enzimáticamente, mediante un 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 ("fluorescence resonance energy transfer", FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, como los basados en guías de ondas ópticas (véase, por ejemplo, publicación PCT WO 96/26432 y patente de EE. UU. n.º 5 677 196), resonancia de plasmón de superficie (SPR), sensores de carga de superficie y sensores de fuerza de superficie, son compatibles con muchas realizaciones de la divulgación.

Además, la presente divulgación contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido de ActRIIB y su compañero de unión. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5 283 317; Zervos *et al.* (1993), *Cell*, 72:223-232; Madura *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.*, 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993), *Biotechniques*, 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993), *Oncogene*, 8:1693-1696). En una realización específica no reivindicada, la presente divulgación contempla el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido de ActRII o trampa de GDF y su proteína de unión [véase, por ejemplo, Vidal y Legrain (1999), *Nucleic Acids Res.*, 27:919-29; Vidal y Legrain (1999), *Trends Biotechnol.*, 17:374-81; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5 525 490; 5 955 280; y 5 965 368].

Los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido de ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido de ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse a nivel de proteínas utilizando procedimientos bioquímicos *in vitro*, tales como la fotorreticulación, la unión de ligandos radiomarcados y la cromatografía de afinidad [véase, por ejemplo, Jakoby W.B. *et al.* (1974), *Methods in Enzymology*, 46:1]. En determinados casos, los compuestos pueden cribarse en un ensayo basado en el mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de ActRIIB. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o en fase fluida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido de ActRIIB puede transfectarse con un sistema indicador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) a una célula y compararse con el banco preferentemente mediante cribado de alto rendimiento o con miembros individuales del banco. Pueden utilizarse otros ensayos de unión basados en el mecanismo; por ejemplo, ensayos de unión que detecten cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con la diana

fijada a un pocillo, esfera o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse normalmente mediante criterios de evaluación colorimétricos o por fluorescencia o resonancia de plasmón de superficie.

4. Ejemplos de usos terapéuticos

5 Como se describe en los ejemplos de la divulgación, se ha descubierto que un antagonista (inhibidor) de ActRIIB puede usarse para tratar pacientes con mielofibrosis, en concreto mejorando diversas complicaciones de la enfermedad, incluidas, por ejemplo, esplenomegalia, hematopoyesis extramedular y fibrosis. En concreto, los datos presentados en el presente documento demuestran que un polipéptido trampa de GDF disminuye la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis en un modelo JAK2V617F de mielofibrosis. Por consiguiente, en
10 determinados aspectos, la divulgación se refiere a composiciones y procedimientos para tratar la mielofibrosis, en concreto para tratar o prevenir una o más complicaciones de la mielofibrosis (esplenomegalia, hematopoyesis extramedular, anemia y fibrosis), administrando a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de ActRIIB, opcionalmente junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos para tratar la mielofibrosis.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, una sustancia terapéutica que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control no tratada. El término "tratar", tal como se utiliza en el presente documento, incluye la mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En
20 cualquier caso, la prevención o el tratamiento pueden discernirse en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro profesional sanitario y el resultado previsto de la administración del agente terapéutico.

En general, el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección como se describe en la presente divulgación se logra administrando un antagonista de ActRIIB en una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz de un agente se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o
25 profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de la presente divulgación puede variar en función de factores tales como el cuadro clínico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del agente para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

Los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" son intercambiables a lo largo de la memoria descriptiva y suelen referirse a mamíferos. Los mamíferos incluyen, entre otros, los animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), los primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos, tales como los monos), los conejos y los roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

La mielofibrosis es un trastorno neoplásico clonal de la hematopoyesis, caracterizado generalmente por una fibrosis progresiva de la médula ósea que da lugar a una hematopoyesis cada vez más ineficaz, hematopoyesis extramedular, una diversidad de complicaciones inflamatorias y una supervivencia acortada [Mascarenhas *et al.* (2012), Curr. Med. Chem., 19:4399-4413; y Vannucchi *et al.* (2011), Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Prog., 2011:222-230]. Es uno de los trastornos mieloproliferativos de la médula ósea en el que se produce un exceso de células. La producción de citocinas, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos, por parte del clon celular hematopoyético anómalo conduce a la sustitución del tejido hematopoyético de la médula ósea por tejido conectivo a través de la fibrosis del
40 colágeno. La disminución del tejido hematopoyético merma la capacidad del paciente para generar nuevas células sanguíneas, lo que provoca una pancitopenia progresiva, es decir, una escasez de todos los tipos de células sanguíneas. Sin embargo, la proliferación de fibroblastos y el depósito de colágeno es un fenómeno secundario, y los propios fibroblastos no forman parte del clon celular anómalo. Como resultado de la cicatrización progresiva, o fibrosis, de la médula ósea, los pacientes desarrollan hematopoyesis extramedular, ya que las células hemopoyéticas se ven obligadas a migrar a otras zonas, en especial el hígado y el bazo. Esto provoca un agrandamiento de estos órganos. En el hígado, la afección se denomina hepatomegalia. El agrandamiento del bazo se denomina esplenomegalia, que también contribuye a la pancitopenia, en especial la trombocitopenia y la anemia. También se han descrito casos de hematopoyesis extramedular en los pulmones y los ganglios linfáticos. Otra complicación de la hematopoyesis extramedular es la poiquilocitosis, es decir, la presencia de hematíes con formas anómalas. Las manifestaciones
50 clínicas habituales de la mielofibrosis incluyen hepatoesplenomegalia progresiva, recuentos sanguíneos anómalos y síntomas debilitantes, tales como fatiga, pérdida de peso, sudores nocturnos, fiebre, prurito, dolor óseo, saciedad precoz, dolor o molestias abdominales, artralgias, mialgias, parestesias, caquexia, infarto esplénico y hemorragias. Hasta hace poco, el único tratamiento con un impacto claramente demostrado sobre la progresión de la enfermedad ha sido el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas ("allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", alloHSCT), pero la mortalidad relacionada con el tratamiento es elevada y sólo una minoría de pacientes cumple los requisitos para recibir este tratamiento intensivo [Gupta *et al.* (2012), Blood, 120: 1367-1379].

Los antagonistas de ActRIIB pueden usarse, solos o junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos, para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis (por ejemplo, mielofibrosis primaria, mielofibrosis posterior a policitemia vera y mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial). En concreto, los
60 antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse, solos o junto con uno o más tratamientos de apoyo o agentes activos, para

tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones de la mielofibrosis, incluidas, por ejemplo, hematopoyesis ineficaz, anemia, inflamación, fibrosis (por ejemplo, fibrosis de la médula ósea, fibrosis del bazo y fibrosis del hígado), pancitopenia, trombocitopenia, hematopoyesis extramedular (por ejemplo, hematopoyesis extramedular esplénica, hematopoyesis extramedular hepática, hematopoyesis extramedular pulmonar y hematopoyesis extramedular linfática), hepatomegalia, esplenomegalia, osteosclerosis, osteomielifibrosis, poiquilocitosis, fatiga, pérdida de peso, sudores nocturnos, fiebre, prurito, dolor óseo, saciedad precoz, dolor o molestias abdominales, artralgias, mialgias, parestesias, caquexia, infarto esplénico y hemorragias.

El diagnóstico actual de la mielofibrosis primaria ("primary myelofibrosis", PMF) se basa en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) e implica una evaluación compuesta de características clínicas y de laboratorio [Tefferi A. *et al.* (2007), *Blood*, 110: 1092-1097]. Existen tres criterios primarios de diagnóstico de la OMS: 1) proliferación y atipia de megacariocitos (megacariocitos de pequeños a grandes con una proporción nuclear/citoplasmática aberrante y núcleos hiperclomáticos e irregularmente plegados y densamente agrupados) acompañados de fibrosis de reticulina y/o colágeno o, en ausencia de fibrosis de reticulina, los cambios megacariocíticos deben ir acompañados de un aumento de la celularidad de la médula, proliferación granulocítica y, a menudo, disminución de la eritropoyesis (es decir, mielofibrosis primaria prefibrótica), 2) no cumplir los criterios de la OMS de leucemia mielógena crónica, policitemia vera, síndrome mielodisplásico u otra neoplasia mielóide, y 3) demostración de *JAK2V617F* otro marcador clonal o ausencia de indicios de fibrosis reactiva de la médula ósea. Además, existen cuatro criterios secundarios de diagnóstico de la OMS: 1) leucoeritroblastosis, 2) aumento de los niveles séricos de LDH, 3) anemia y 4) esplenomegalia palpable. La leucoeritroblastosis de la sangre periférica (es decir, la presencia de eritrocitos nucleados, granulocitos inmaduros y dacriocitos) es una característica típica, pero no invariable de la PMF; la PMF prefibrótica podría no mostrar leucoeritroblastosis manifiesta [Kvasnicka *et al.* (2010), *Am. J. Hematol.*, 85:62-69]. La fibrosis de la médula ósea en la PMF suele estar asociada a *JAK2V617F* o *CALR* mutante, o *MPL*, trisomía 9 o del(13q) [Hussein *et al.* (2009), *Eur. J. Haematol.*, 82:329-338]. La presencia de estos marcadores genéticos, por lo tanto, apoya firmemente el diagnóstico de la PMF, en presencia de una neoplasia mielóide asociada a fibrosis de la médula ósea. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de los antagonistas de *ActRIIB* para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis primaria, en concreto para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones de la mielofibrosis primaria.

El diagnóstico actual de la mielofibrosis posterior a policitemia vera (MF post-PV) y de la mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial (MF post-ET) se basa en los criterios publicados por el Grupo de Trabajo Internacional para la Investigación y el Tratamiento de la NMC ("International Working Group for MPN Research and Treatment", IWG-MRT) [Barosi G. *et al.* (2008), *Leukemia*, 22:437-438]. Existen dos criterios primarios del IWG-MRT para la MF post-PV: 1) documentación de diagnóstico previo de policitemia vera según los criterios de la OMS, y 2) fibrosis de la médula ósea de grado 2-3 (en una escala de 0-3) o de grado 3-4 (en una escala de 0-4). Grado 2-3 según la clasificación europea: red de fibras difusa, a menudo gruesas, sin indicios de colagenización (tinción tricrómica negativa) o red de fibras difusa, gruesas, con zonas de colagenización (tinción tricrómica positiva) [Thiele *et al.* (2005), *Haematologica*, 90:1128-1132]. Grado 3-4 según la clasificación convencional: aumento difuso y denso de la reticulina con muchas intersecciones, a veces sólo con haces focales de colágeno y/u osteosclerosis focal o aumento difuso y denso de la reticulina con muchas intersecciones con haces gruesos de colágeno, a menudo asociado con osteosclerosis significativa [Manoharan *et al.* (1979), *Br. J. Haematol.*, 43:185-190]. Además, existen cuatro criterios secundarios de diagnóstico del IWG-MRT, de los cuales dos deben detectarse en un paciente junto con los criterios primarios del IWG-MRT para un diagnóstico de MF post-PV: 1) anemia o pérdida sostenida de la necesidad de flebotomía en ausencia de terapia citorreductora, 2) un cuadro de sangre periférica leucoeritroblástica, 3) aumento de la esplenomegalia definida como un aumento de la esplenomegalia palpable de ≥ 5 cm o la aparición de una nueva esplenomegalia palpable, 4) desarrollo de ≥ 1 de tres síntomas generales: pérdida de peso >10 % en seis meses, sudores nocturnos, fiebre inexplicable. Existen dos criterios primarios del IWG-MRT para la MF post-ET: 1) documentación de un diagnóstico previo de policitemia vera según los criterios de la OMS, 2) fibrosis de la médula ósea de grado 2-3 (en una de escala 0-3) o de grado 3-4 (en una escala de 0-4). Además, existen cinco criterios secundarios de diagnóstico del IWG-MRT, de los cuales dos deben detectarse en un paciente junto con los criterios primarios del IWG-MRT para un diagnóstico de MF post-ET: 1) anemia y una disminución ≥ 2 g/dl de los niveles de referencia de hemoglobina, 2) un cuadro de sangre periférica leucoeritroblástica, 3) aumento de la esplenomegalia definida como un aumento de la esplenomegalia palpable de ≥ 5 cm o la aparición de una nueva esplenomegalia palpable, 4) aumento de la lactato deshidrogenasa, y 5) desarrollo de ≥ 1 de tres síntomas generales: pérdida de peso >10 % en seis meses, sudores nocturnos, fiebre inexplicable. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de los antagonistas de *ActRIIB* para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis posterior a policitemia vera, en concreto para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones de la mielofibrosis posterior a policitemia vera. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de los antagonistas de *ActRIIB* para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis posterior a la trombocitemia esencial, en concreto para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones de la mielofibrosis posterior a la trombocitemia esencial.

La modelización pronóstica robusta en la mielofibrosis comenzó con el desarrollo del Sistema Internacional de Puntuación Pronóstica ("International Prognostic Scoring System", IPSS) en 2009 [Cervantes F. *et al.* (2009), *Blood*, 113:2895-2901]. El IPSS para la mielofibrosis es aplicable a pacientes que están siendo evaluados en el momento del

diagnóstico inicial y utiliza cinco predictores independientes de supervivencia inferior: edad >65 años, hemoglobina <10 g/dl, recuento de leucocitos >25 × 10⁹/l, blastos circulantes ≥1 % y presencia de síntomas generales. La presencia de 0, 1, 2 y ≥3 factores adversos define la enfermedad de riesgo bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto, respectivamente. Las correspondientes medianas de supervivencia son de 11,3, 7,9, 4 y 2,3 años, respectivamente.

También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de los antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis en un paciente con mielofibrosis de riesgo bajo, intermedio-1, intermedio-2 o alto según el IPSS. En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a procedimientos y usos de antagonistas de ActRIIB para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis según el IPSS (por ejemplo, se previene o retrasa la progresión del riesgo de bajo a intermedio-1, de intermedio-1 a intermedio-2 y de intermedio-2 a alto según el IPSS). En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a procedimientos y usos de antagonistas de ActRIIB para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis según el IPSS (por ejemplo, se favorece o aumenta la regresión de riesgo alto a intermedio-2, de intermedio-2 a intermedio-1 y de intermedio-1 a bajo según el IPSS).

Posteriormente, el IWG-MRT desarrolló un modelo de pronóstico dinámico (sistema internacional de puntuación de pronóstico dinámico ["dynamic international prognostic scoring system", DIPSS]) que utiliza las mismas variables de pronóstico que el IPSS, pero que puede aplicarse en cualquier momento de la evolución de la enfermedad [Passamonti F. *et al.* (2010), *Blood*, 115:1703-1708]. El DIPSS asigna dos, en lugar de uno, puntos adversos para la hemoglobina <10 g/dl y la categorización del riesgo se modifica en consecuencia: bajo (0 puntos adversos), intermedio-1 (1 o 2 puntos), intermedio-2 (3 o 4 puntos) y alto (5 o 6 puntos). No se alcanzaron las correspondientes medianas de supervivencia, 14,2, 4 y 1,5 años. En determinados aspectos, la divulgación se refiere a usos de antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis en un paciente que tiene mielofibrosis de riesgo bajo, intermedio-1, intermedio-2 o alto según el DIPSS. En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a usos de antagonistas de ActRIIB para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis según el DIPSS (por ejemplo, se previene o retrasa la progresión del riesgo de bajo a intermedio-1, de intermedio-1 a intermedio-2 y de intermedio-2 a alto según el DIPSS). En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a usos de antagonistas de ActRIIB para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis según el DIPSS (por ejemplo, se favorece o aumenta la regresión de riesgo alto a intermedio-2, de intermedio-2 a intermedio-1 y de intermedio-1 a bajo según el DIPSS).

Posteriormente se identificaron factores de riesgo independientes del IPSS y el DIPSS para la supervivencia en la mielofibrosis, entre los que se incluía el cariotipo desfavorable (es decir, cariotipo complejo o una o dos anomalías que incluyen reordenamiento +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- u 11q23) [Hussein *et al.* (2010), *Blood*, 115:496-499], necesidad de transfusión de hematíes [Tefferi *et al.* (2009), *Am. J. Hematol.*, 85:14-17], y recuento de plaquetas <100 × 10⁹/l [Patnaik *et al.* (2010), *Eur. J. Haematol.*, 84:105-108]. En consecuencia, el DIPSS se modificó para convertirlo en DIPSS-plus mediante la incorporación de estos tres factores de riesgo adicionales independientes del DIPSS: recuento de plaquetas <100 × 10⁹/l, necesidad de transfusión de hematíes y cariotipo desfavorable. Las cuatro categorías de riesgo del DIPSS-plus basadas en los ocho factores de riesgo mencionados son bajo (sin factores de riesgo), intermedio-1 (un factor de riesgo), intermedio-2 (dos o tres factores de riesgo) y alto (cuatro o más factores de riesgo), con unas medias de supervivencia respectivas de 15,4, 6,5, 2,9 y 1,3 años. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de los antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis en un paciente con mielofibrosis de riesgo bajo, intermedio-1, intermedio-2 o alto según el DIPSS-plus. En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a usos de antagonistas de ActRIIB para prevenir o retrasar la progresión del riesgo de mielofibrosis según el DIPSS-plus (por ejemplo, se previene o retrasa la progresión del riesgo de bajo a intermedio-1, de intermedio-1 a intermedio-2, y de intermedio-2 a alto según el DIPSS-plus). En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a usos de antagonistas de ActRIIB para favorecer o aumentar la regresión del riesgo de mielofibrosis según el DIPSS-plus (por ejemplo, se favorece o aumenta la regresión de riesgo alto a intermedio-2, de intermedio-2 a intermedio-1 y de intermedio-1 a bajo según el DIPSS-plus).

Desde la publicación del DIPSS-plus, se han publicado varios estudios que sugieren información pronóstica adicional. Por ejemplo, se predijo una mortalidad >80 % a los 2 años en la mielofibrosis por cariotipo monosómico, anomalías inv(3)/i(17q), o cualesquiera dos de blastos circulantes >9 %, leucocitos ≥40 × 10⁹/l u otro cariotipo desfavorable [Tefferi *et al.* (2011), *Blood*, 118:4595-4598]. Del mismo modo, la supervivencia inferior en la mielofibrosis se ha asociado con la nulicigosidad del haplotipo JAK2 46/1, la baja carga alélica de JAK2V617F o la presencia de mutaciones de IDH, EZH2, SRSF2 o ASXL1 [Tefferi, Ayalew (2014), *Am. J. Hematol.*, 89:916-925]. Por el contrario, la presencia o ausencia de mutaciones de JAK2V617F, MPL o TET2 no pareció afectar a la supervivencia. La supervivencia en la mielofibrosis también se vio afectada por el aumento de los niveles séricos de IL-8 e IL-2R, así como por los niveles séricos de cadenas ligeras libres, ambos independientes del DIPSS-plus. Más recientemente, Tefferi *et al.* estudiaron 254 pacientes con mielofibrosis y notificaron unas frecuencias mutacionales del 58 % para JAK2, del 25 % para CALR, del 8 % para MPL y del 9 % para el tipo salvaje para las tres mutaciones (es decir, triple negativo) [Tefferi *et al.* (2014), *Leukemia*. prepublicado como DOI 10.1038/leu.2014.3]. La frecuencia mutacional de CALR en los casos sin mutación de JAK2/MPL fue del 74 %. Las mutaciones de CALR se asociaron a una edad más temprana, un recuento de plaquetas más elevado y una puntuación DIPSS-plus más baja. Los pacientes con mutación de CALR también tenían menos probabilidades de sufrir anemia, necesitar transfusiones o presentar leucocitosis. Las mutaciones del espliceosoma eran infrecuentes en los pacientes con mutaciones de CALR. En un estudio internacional posterior de 570 pacientes, los autores notificaron la mayor supervivencia en los pacientes CALR+ASXL1- (mediana

de 10,4 años) y la menor en los pacientes CALR-ASXL1+ (mediana de 2,3 años) [Tefferi *et al.* (2014), *Leukemia*, prepublicado como DOI 10.1038/leu.2014.57]. Los pacientes CALR+ASXL1+ y CALR-ASXL1- tuvieron una supervivencia similar y se agruparon en una categoría de riesgo intermedio (mediana de supervivencia de 5,8 años). Como se está haciendo evidente para la supervivencia global, la supervivencia sin leucemia también se ve significativamente comprometida en pacientes portadores de determinadas mutaciones, incluidas las de IDH y SRSF2 [Tefferi *et al.* (2012), *Leukemia*, 26:475-480; Lasho *et al.* (2012), *Blood*, 120:4168-4171]. Además, las mutaciones en LNK y THPO también se han asociado a la mielofibrosis.

El descubrimiento de una mutación de ganancia de función de la cinasa Janus 2 (*JAK2*), *JAK2V617F*, ha llevado a mejoras significativas en la comprensión de la biología subyacente a la mielofibrosis, así como al desarrollo de ruxolitinib, un inhibidor de *JAK2* que es el primer fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la mielofibrosis [Baxter *et al.* (2005), *Lancet*, 365:1054-1061; James C. *et al.* (2005), *Nature*, 434:1144-1148; Kralovics *et al.* (2005), *N. Engl. J. Med.*, 352:1779-1790; y Levine *et al.* (2005), *Cancer Cell*, 7:387-397]. La familia de la cinasa Janus de receptores tirosina cinasa incluye cuatro proteínas diferentes (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *TYK2*), y se sabe que esta familia de proteínas desempeña un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las células mieloides y linfoides. En concreto, median en las interacciones intracelulares de los receptores de citocinas, lo que da lugar a la activación de los factores transductores de señales y activadores de la transcripción ("signal transducer activator of transcription", *STAT*) y al estímulo corriente abajo de genes que regulan la proliferación y la diferenciación celular [Quintas-Cardama *et al.* (2011), *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10:127-140]. La mutación *JAK2V617F* provoca la activación constitutiva de *JAK2* y, por tanto, estimula la proliferación y diferenciación de las células mieloides. Otros inhibidores de la cinasa Janus en fase de ensayo clínico son, por ejemplo, fedratinib (SAR302503), monelotinib (CYT387), pacritinib, lestaurtinib, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 y AT-9283.

También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis en un paciente que tiene uno o más de: cariotipo monosómico, anomalías inv(3)/i(17q), blastos circulantes >9 % y/o leucocitos $\geq 40 \times 10^9/l$, nulicigosidad para el haplotipo *JAK2* 46/1, mutación *JAK2V617F*, mutación de *IDH1*, mutación de *IDH2*, mutación de *EZH2*, mutación de *SRSF2*, mutación de *ASXL1*, aumento de los niveles séricos de IL-8, aumento de los niveles séricos de IL-2R, aumento de los niveles de cadenas ligeras libres, mutación de *JAK1*, mutación de *JAK2*, mutación de *JAK3*, mutación de *TYK2*, mutación de *MPL*, mutación de *CALR*, *CALR+ASXL1-*, *CALR+ASKL1+*, *CALR+ASKL1+*, *CALR+ASKL1-*, mutación de *TET2*, mutación de *THPO* y mutación de *LNK*.

El tratamiento de la anemia puede ser uno de los aspectos más difíciles del tratamiento de los pacientes con mielofibrosis [Tefferi A. (2011), *Blood*, 117(13):3949-3504; Barosi *et al.* (2011), *Expert Opin. Pharmacother.*, 12(10): 1597-1611]. La transfusión de sangre (transfusión de sangre total o de glóbulos rojos) es un tratamiento convencional para los pacientes con mielofibrosis sintómicamente anémicos. Además de la transfusión, existe una variedad de agentes convencionales utilizados para tratar la anemia en estos pacientes. Por ejemplo, los agentes estimulantes de la eritropoyesis [por ejemplo, los AEE, tales como la eritropoyetina (EPO) y sus derivados], los andrógenos (por ejemplo, el enantato de testosterona y la fluoximesterona), la prednisona, el danazol, la talidomida, la prednisona y la lenalidomida se utilizan habitualmente para tratar la anemia en pacientes con mielofibrosis. En general, los AEE se utilizan en pacientes con anemia moderada no dependiente de transfusión y niveles séricos bajos de eritropoyetina. Las tasas de respuesta varían entre el 20-60 %, sin que exista un apoyo claro a la darbepoetina-alfa frente a la eritropoyetina recombinante convencional. Las respuestas de los AEE suelen ser de corta duración (alrededor de 1 año). Si los AEE no funcionan o su eficacia es escasa, suelen utilizarse preparados de danazol o andrógenos para tratar a los pacientes anémicos, con una tasa de respuesta de aproximadamente el 20 %. La talidomida a dosis bajas en asociación con la disminución de la prednisona ha producido respuestas en la anemia en aproximadamente el 20-40 % de los pacientes [Thapaliya *et al.* (2011), *Am. J. Hematol.*, 86(1):86-98]. Sin embargo, el tratamiento con talidomida suele tolerarse mal, con neuropatías periféricas, estreñimiento y somnolencia que conducen a la interrupción del fármaco en la mayoría de los pacientes. En los pacientes con mielofibrosis con anemia asociada al del(5q31), la lenalidomida es el tratamiento de primera línea recomendado, ya que se ha descrito una mejoría significativa, con resolución de la anemia y, a veces, evidencia de remisión molecular [Tefferi *et al.* (2007), *Leukemia*, 21(8):1827-1828]. También se describen, aunque no se reivindican, procedimientos y usos de los antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis en un paciente que padece anemia. En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a usos de antagonistas de ActRIIB para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la anemia en un paciente con mielofibrosis. En el presente documento también se describe, pero no se reivindica, un procedimiento para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis en un paciente que lo necesite, que comprende la administración de uno o más antagonistas de ActRIIB junto con uno o más agentes activos adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un agente estimulante de la eritropoyesis [por ejemplo, AEE, tal como eritropoyetina (EPO) y sus derivados], andrógeno (por ejemplo, enantato de testosterona y fluoximesterona), prednisona, danazol, talidomida, prednisona y lenalidomida. En el presente documento también se describe, pero no se reivindica, un procedimiento para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la anemia en un paciente con mielofibrosis que lo necesite, que comprende la administración de uno o más antagonistas de ActRIIB junto con uno o más agentes activos adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un agente estimulante de la eritropoyesis [por ejemplo, AEE, tal como eritropoyetina (EPO) y sus derivados], andrógeno (por ejemplo, enantato de testosterona y fluoximesterona), prednisona, danazol, talidomida, prednisona y lenalidomida. En el presente documento también se describe, pero no

se reivindica, un procedimiento para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la anemia en un paciente con mielofibrosis que lo necesite, que comprende la administración de uno o más antagonistas de ActRIIB junto con una transfusión de sangre (sangre total o transfusión de glóbulos rojos).

Cuando se controlan los niveles de hemoglobina y/o hematocrito 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 10-12,5 g/dl, y generalmente de aproximadamente 11,0 g/dl se considera dentro del intervalo normal en adultos sanos, aunque, en lo tocante al tratamiento, un nivel diana más bajo puede causar menos efectos secundarios cardiovasculares. Véase, por ejemplo, Jacobs *et al.* (2000), *Nephrol. Dial Transplant*, 15, 15-19. Como alternativa, los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupado por las células) pueden utilizarse como medida de la anemia. Los niveles del hematocrito en individuos sanos oscilan en torno a aproximadamente el 41-51 % en hombre adultos y el 35-45 % en mujeres adultas. Un paciente puede ser tratado con una pauta posológica destinada a que el paciente vuelva a un nivel diana de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito o a reducir o eliminar las transfusiones de glóbulos rojos (reducir la carga de transfusiones) mientras se mantiene un nivel aceptable de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito. Como los niveles de hemoglobina y hematocrito varían de una persona a otra, lo óptimo es que el nivel diana de hemoglobina y/o hematocrito pueda individualizarse para cada paciente.

En los pacientes que reciben transfusiones frecuentes de sangre total o glóbulos rojos, los mecanismos normales de homeostasis del hierro pueden verse desbordados, lo que finalmente conduce a una acumulación tóxica y potencialmente mortal de hierro en tejidos vitales, tales como el corazón, el hígado y las glándulas endocrinas. Las transfusiones periódicas de hematíes requieren la exposición a diferentes unidades de sangre de donantes y, por tanto, un mayor riesgo de aloinmunización. Las dificultades de acceso vascular, la disponibilidad y el cumplimiento de la quelación del hierro y el elevado coste son algunas de las razones por las que puede ser beneficioso limitar el número de transfusiones de hematíes.

Uno o más antagonistas de ActRIIB, opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO, pueden usarse junto con una o más moléculas quelantes del hierro para estimular la excreción de hierro en la orina y/o las heces y, de ese modo, prevenir o revertir la sobrecarga tisular de hierro en pacientes con mielofibrosis. Los agentes quelantes del hierro eficaces deben ser capaces de unirse selectivamente y neutralizar el hierro férrico, la forma oxidada del hierro no unido a la transferrina que probablemente es responsable de la mayor parte de la toxicidad del hierro a través de la producción catalítica de radicales hidroxilo y productos de la oxidación [véase, por ejemplo, Esposito *et al.* (2003), *Blood*, 102:2670-2677]. Estos agentes son estructuralmente diversos, pero todos poseen átomos donantes de oxígeno o nitrógeno capaces de formar complejos de coordinación octaédricos neutralizantes con átomos de hierro individuales en estequiometrías de 1:1 (agentes hexadentados), 2:1 (tridentados) o 3:1 (bidentados) [Kalinowski *et al.* (2005), *Pharmacol. Rev.*, 57:547-583]. En general, los agentes quelantes del hierro eficaces también tienen un peso molecular relativamente bajo (por ejemplo, menos de 700 daltons), con solubilidad tanto en agua como en lípidos para permitir el acceso a los tejidos afectados. Algunos ejemplos específicos de moléculas quelantes del hierro son la deferoxamina, un agente hexadentado de origen bacteriano que requiere una administración parenteral diaria, y los agentes sintéticos activos por vía oral deferiprona (bidentado) y deferasirox (tridentado). El tratamiento combinado consistente en la administración en el mismo día de dos agentes quelantes del hierro resulta prometedor en pacientes que no responden a la monoterapia de quelación y también para superar los problemas de escaso cumplimiento por parte de los pacientes con la deferoxamina sola [Cao *et al.* (2011), *Pediatr. Rep.*, 3(2):e17; y Galanello *et al.* (2010), *Ann. NY Acad. Sci.*, 1202:79-86].

Uno o más antagonistas de ActRIIB de la divulgación pueden usarse junto con un activador del receptor de EPO para lograr un aumento de glóbulos rojos, especialmente en intervalos de dosis más bajos. Esto puede ser beneficioso para reducir los conocidos efectos inespecíficos y los riesgos asociados a las altas dosis de activadores de los receptores de la EPO. Los principales efectos adversos de los AEE incluyen, por ejemplo, un aumento excesivo de los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles elevados de hematocrito pueden provocar hipertensión (más concretamente, agravamiento de la hipertensión). Otros efectos adversos de los AEE que se han notificado, algunos de ellos relacionados con la hipertensión, son cefaleas, síndrome gripal, obstrucción de las derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales por trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplasia de glóbulos rojos. Véase, por ejemplo, Singibarti (1994), *J. Clin. Investig.*, 72(supl. 6), S36-S43; Horl *et al.* (2000), *Nephrol. Dial Transplant*, 15(supl. 4), 51-56; Delanty *et al.* (1997), *Neurology*, 49, 686-689; y Bunn (2002), *N. Engl. J. Med.*, 346(7), 522-523). En el presente documento también se describen, pero no se reivindican, procedimientos para tratar o prevenir la anemia en un paciente con mielofibrosis, mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más antagonistas de ActRIIB y un activador del receptor de EPO. Un antagonista de ActRIIB puede utilizarse junto con activadores del receptor de EPO para reducir la dosis necesaria de estos activadores en pacientes susceptibles a los efectos adversos de los AEE. Estos procedimientos pueden utilizarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de un paciente.

Siempre que los antagonistas de ActRIIB de la presente divulgación actúen por un mecanismo diferente que los AEE, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a los AEE u otros activadores del receptor de EPO. Por ejemplo, un antagonista de ActRIIB de la presente divulgación puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis de normal a

aumentada (>300 UI/kg/semana) de AEE no produzca un aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel diana. Una respuesta inadecuada a los AEE puede ser constitutiva (observada en el primer tratamiento con AEE) o adquirida (observada en tratamientos repetidos con AEE).

Los agentes citorreductores han sido el tratamiento preferido para la mayoría de los pacientes con esplenomegalia sintomática. La hidroxycarbamida (hidroxiurea, HC) es el agente citorreductor más utilizado, que suele producir respuestas modestas a dosis elevadas. Sin embargo, la HC a menudo puede exacerbar las citopenias y, por lo tanto, no suele ser bien tolerada. Se han descrito reducciones del tamaño del bazo de entre el 25 % y el 50 % en hasta el 35 % de los pacientes tratados con HC [Martínez-Trillos *et al.* (2010), *Ann. Hematol.*, 89(12):1233-71237]. En los pacientes que no responden a la HC, puede utilizarse busulfán o melfalán, especialmente en pacientes de edad avanzada, ya que existen pruebas de que estos agentes pueden aumentar la frecuencia de transformación leucémica. Las respuestas del bazo con dosis bajas de talidomida son bajas (<20 %). Sin embargo, se ha demostrado que la lenalidomida produce una tasa de respuesta del 33 % en un estudio que incluyó a algunos pacientes en los que había fracasado el tratamiento previo con talidomida. En casos de esplenomegalia masiva refractaria, los ciclos mensuales de cladribina intravenosa han producido respuestas de hasta el 50 %, siendo la principal toxicidad las citopenias graves, pero reversibles [Faoro *et al.* (2005), *Eur. J. Haematol.*, 74(2):117-120]. El ruxolitinib ha demostrado ser superior a HC en estudios recientes, por lo que se está convirtiendo en agente de primera línea para controlar la esplenomegalia sintomática o progresiva. Por desgracia, un efecto secundario frecuente del ruxolitinib es la aparición o el empeoramiento de la anemia en los pacientes con mielofibrosis. Por lo tanto, aunque los inhibidores de JAK pueden ser útiles para tratar la esplenomegalia, en realidad pueden empeorar otras complicaciones de la mielofibrosis, en especial la anemia y los trastornos asociados a ella.

Además de la inhibición de JAK2, se están investigando otras estrategias terapéuticas para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos, incluidos fármacos inmunomoduladores (por ejemplo, pomalidomida), inhibidores de la diana de mamíferos de la vía de mTOR (por ejemplo, rapamicina, sirolimus, deforolimus, everolimus, temsirolimus, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055 y AZD2014) y moduladores de factores epigenéticos (por ejemplo, inhibidores de las histonas desacetilasas, tales como givinostat (ITF2357), panobinostat (LBH589) y pracinostat) [Mascarenhas *et al.* (2013), *Haematologica*, 98(10):1499-1509].

La presente divulgación contempla además el uso del antagonista de ActRIIB junto con una o más modalidades terapéuticas en el tratamiento de pacientes como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los antagonistas de ActRIIB pueden administrarse junto con citotoxinas, agentes inmunosupresores, agentes radiotóxicos y/o anticuerpos terapéuticos. Las sustancias terapéuticas conjuntas concretas contempladas por la presente invención incluyen, entre otras, esteroides (por ejemplo, corticoesteroides, tal como prednisona), agentes inmunosupresores y/o antiinflamatorios (por ejemplo, gamma-interferón, ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato, penicilamina, ciclosporina, colchicina, globulina antitumoral, micofenolato mofetilo e hidroxycicloroquina), fármacos citotóxicos, bloqueantes de los canales del calcio (por ejemplo, nifedipino), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), ácido para-aminobenzoico (PABA), dimetilsulfóxido, inhibidores del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), inhibidores de la interleucina-5 (IL-5) e inhibidores de pancaspasas. Los agentes adicionales que pueden usarse junto con el antagonista de ActRIIB incluyen, entre otros, lectinas (como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7 026 283), así como los agentes antifibróticos descritos por Wynn *et al.* (2007, *J. Clin. Invest.*, 117:524-529). Por ejemplo, los agentes y tratamientos antifibróticos adicionales incluyen, entre otros, diversos fármacos antiinflamatorios/inmunosupresores/citotóxicos (incluidos colchicina, azatioprina, ciclofosfamida, prednisona, talidomida, pentoxifilina y teofilina), modificadores de la señalización de TGFβ (incluidos relaxina, SMAD7, HGF y BMP7, así como inhibidores de TGFβ1, TβRI, TβRII, EGR-1 y CTGF), antagonistas de citocinas y receptores de citocinas (inhibidores de IL-1β, IL-5, IL-6, IL-13, IL-21, IL-4R, IL-13Rα1, GM-CSF, TNF-α, oncostatina M, WISP-1 y PDGF), citocinas y quimiocinas (IFN-γ, IFN-α/β, IL-12, IL-10, HGF, CXCL10 y CXCL11), antagonistas de quimiocinas (inhibidores de CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17 y CCL18), antagonistas de receptores de quimiocinas (inhibidores de CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 y CXCR4), antagonistas de TLR (inhibidores de TLR3, TLR4 y TLR9), antagonistas de la angiogénesis (anticuerpos específicos del VEGF y terapia de sustitución de la adenosina desaminasa), antihipertensivos (betabloqueantes e inhibidores de la ANG 11, ECA y aldosterona), sustancias vasoactivas (antagonistas del receptor de ET-1 y bosetano), inhibidores de las enzimas que sintetizan y procesan el colágeno (inhibidores de la prolilhidroxilasa), antagonistas de linfocitos B (rituximab), antagonistas de moléculas de adhesión/integrina (moléculas que bloquean las integrinas α1β1 y αvβ6, así como inhibidores de la cinasa ligada a la integrina y anticuerpos específicos para ICAM-1 y VCAM-1), fármacos proapoptóticos dirigidos a los miofibroblastos, inhibidores de MMP (inhibidores de MMP2, MMP9 y MMP12) e inhibidores de TIMP (anticuerpos específicos para TIMP-1).

Un antagonista de ActRIIB puede usarse por sí solo para tratar a un paciente que lo necesite. Como alternativa, los antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse junto con enfoques terapéuticos convencionales dirigidos al tratamiento o la prevención de los trastornos proliferativos descritos en el presente documento, incluidos, por ejemplo, cirugía (por ejemplo, esplenectomía), agentes citotóxicos, tratamientos radiológicos que implican irradiación o administración de sustancias radiactivas, agentes quimioterapéuticos, agentes antihormonales, agentes inhibidores del crecimiento, composiciones antineoplásicas y tratamiento con agentes antineoplásicos enumerados en el presente documento y conocidos en la técnica, o combinaciones de los mismos.

En general, un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las mismas. La expresión incluye isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , ^{113}I , ^{125}I , ^{90}Y , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos sus fragmentos y/o variantes, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos que se describen a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida provoca la destrucción de las células tumorales.

En general, un agente quimioterapéutico es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, tales como altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (en especial bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en concreto criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clomafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplos, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma II y calicheamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluida la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y la cromoproteína relacionadas enediina, cromóforos antibióticos), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluidas morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como la mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purinas, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidinas, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico, tales como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxixurea; lentinán; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremophor, formulación de paclitaxel en nanopartículas modificadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovin; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMYELOFIBROSIS O); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovin.

También están los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden favorecer el crecimiento del cáncer, y a menudo están en forma de tratamiento sistémico, o para todo el cuerpo. Pueden ser las propias hormonas. Algunos ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores estrogénicos ("selective estrogen receptor modulators", SERM), entre los que se incluyen, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno EVISTA®, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LYI 17018, la onapristona y el toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores a la baja de los receptores de estrógenos ("estrogen receptor down-regulators", ERD); agentes que actúan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona

luteinizante (LHRH), tales como el acetato de leuprolida LUPRON® y ELIGARD®, el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la triptorelina; otros antiandrógenos, tales como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, los 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol MEGASE®, el exemestano AROMASIN®, el formestano, el fadrozol, el vorozol RIVIS OR®, el letrozol FEMARA® y el anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato DIDROC AL®, NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato ZOMET A®, el alendronato FOSAMAX®, el pamidronato AREDIA®, el tiludronato SKELID® o el risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un nucleósido de 1,3-dioxolano análogo de la citosina); oligonucleótidos antisentido, en concreto los que inhiben la expresión de genes en vías de transducción de señales implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; el rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de la tirosina cinasa dual ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un agente inhibidor del crecimiento se refiere generalmente a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser un agente que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en otro punto distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M son las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Los agentes que detienen el G1 también provocan la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN, tales como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el ara-C. Se encontrará más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami *et al.* (WB Saunders, Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos contra el cáncer derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel estimulan el ensamblaje de los microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos impidiendo su despolimerización, lo que provoca la inhibición de la mitosis en las células.

Un antagonista de ActRIIB y un agente activo adicional (por ejemplo, un agente coterapéutico) pueden administrarse en la misma formulación o por separado. En el caso de la administración separada, el antagonista de ActRIIB puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente activo adicional. Un agente puede preceder o seguir a la administración del otro en intervalos que varían de minutos a semanas. Cuando dos o más tipos diferentes de agentes terapéuticos se aplican por separado a un sujeto, generalmente habrá que garantizar que no transcurra un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de manera que estos diferentes tipos de agentes todavía puedan ejercer un efecto combinado ventajoso sobre los tejidos o células diana.

En el presente documento también se describen, pero no se reivindican, procedimientos para tratar a un paciente que ha sido tratado con uno o más agentes antagonistas de ActRIIB de la divulgación, o que es candidato a ser tratado con los mismos, midiendo uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos pueden utilizarse para evaluar la dosis adecuada para un paciente candidato a ser tratado con el antagonista de la presente divulgación, para controlar los parámetros hematológicos durante el tratamiento, para evaluar si es necesario ajustar la dosis durante el tratamiento con uno o más antagonistas de la divulgación y/o para evaluar una dosis de mantenimiento adecuada de uno o más antagonistas de la divulgación. Si uno o más de los parámetros hematológicos están fuera del nivel normal, la dosis de uno o más antagonistas de ActRIIB puede reducirse, retrasarse o interrumpirse.

Los parámetros hematológicos que pueden ser medidos de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, por ejemplo, niveles de glóbulos rojos, presión sanguínea, reservas de hierro y otros agentes que se encuentran en líquidos corporales que se correlacionan con unos niveles aumentados de glóbulos rojos, usando procedimientos reconocidos en la técnica. Dichos parámetros pueden determinarse utilizando una muestra de sangre de un paciente. El aumento de los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito puede provocar un aumento de la tensión arterial.

Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal o en el lado alto de la normalidad en un paciente que es candidato a ser tratado con uno o más antagonistas de ActRIIB, entonces el inicio de la administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación puede retrasarse hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable de forma natural o mediante intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, puede ser tratado con un agente hipotensor para reducir su tensión arterial. Puede utilizarse cualquier agente hipotensor adecuado para el estado de cada paciente, incluidos, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (incluidos alfabloqueantes y betabloqueantes), vasodilatadores, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) o bloqueantes de los receptores

de la angiotensina II. Como alternativa, la tensión arterial puede tratarse con una dieta y ejercicio físico. Del mismo modo, si un paciente candidato tiene reservas de hierro inferiores a los normales, o en el lado bajo de la normalidad, entonces el paciente puede ser tratado con un régimen adecuado de dieta y/o suplementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a un nivel normal o aceptable. En el caso de pacientes con niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina más altos de los normales, la administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación puede retrasarse hasta que los niveles hayan vuelto a un nivel normal o aceptable.

Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal o en el lado alto de la normalidad en un paciente candidato a ser tratado con uno o más antagonistas de ActRIIB, entonces el inicio de la administración puede no retrasarse. Sin embargo, la cantidad de dosis o la frecuencia de administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación puede establecerse en una cantidad que reduzca el riesgo de un aumento inaceptable de los parámetros hematológicos que surgen tras la administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación. Como alternativa, se puede desarrollar un tratamiento para el paciente que combine uno o más antagonistas de ActRIIB con un agente terapéutico que aborde el nivel indeseable del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente presenta tensión arterial elevada, puede diseñarse un tratamiento que incluya la administración de uno o más agentes antagonistas de ActRIIB del y un agente hipotensor. Para un paciente con reservas de hierro inferiores a las deseadas, puede desarrollarse un tratamiento que incluya uno o más antagonistas de ActRIIB de la divulgación y suplementos de hierro.

Los parámetros de referencia para uno o más parámetros hematológicos pueden establecerse para un paciente candidato a ser tratado con uno o más antagonistas de ActRIIB de la divulgación y una pauta posológica adecuada establecida para ese paciente en función de los valores de referencia. Como alternativa, pueden utilizarse unos parámetros de referencia establecidos basados en el historial médico de un paciente, para fundamentar una pauta posológica de antagonista adecuada para un paciente. Por ejemplo, si un paciente sano tiene una lectura de tensión arterial de referencia establecida que está por encima del intervalo normal definido, puede no ser necesario llevar la tensión arterial del paciente al intervalo que se considera normal para la población general antes del tratamiento con uno o más antagonistas de la divulgación. Los valores de referencia de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con uno o más antagonistas de ActRIIB de la divulgación también pueden usarse como valores comparativos relevantes para realizar el seguimiento de cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con dichos uno o más antagonistas de la divulgación.

Se miden uno o más parámetros hematológicos en pacientes que están siendo tratados con uno o más antagonistas de ActRIIB. Los parámetros hematológicos pueden utilizarse para controlar al paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o la finalización de la administración con dichos uno o más antagonistas de la divulgación o la administración adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de uno o más antagonistas de ActRIIB produce un aumento de la tensión arterial, del nivel de glóbulos rojos o del nivel de hemoglobina, o una reducción de las reservas de hierro, la dosis de dichos uno o más antagonistas de la divulgación puede reducirse en cantidad o frecuencia para disminuir los efectos de dichos uno o más antagonistas de la divulgación sobre uno o más parámetros hematológicos. Si la administración de uno o más antagonistas de ActRIIB produce un cambio en uno o más parámetros hematológicos adverso para el paciente, la administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación puede interrumpirse temporalmente, hasta que el parámetro o parámetros hematológicos vuelvan a un nivel aceptable, o permanentemente. Del mismo modo, si uno o más parámetros hematológicos no se sitúan dentro de un intervalo aceptable tras reducir la dosis o la frecuencia de administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación, se puede interrumpir la administración. Como alternativa, o además de reducir o terminar la administración de dichos uno o más antagonistas de la divulgación, el paciente puede recibir un agente terapéutico adicional que aborde el nivel indeseable del parámetro o parámetros hematológicos, tal como, por ejemplo, un agente hipotensor o un suplemento de hierro. Por ejemplo, si un paciente que está siendo tratado con uno o más antagonistas de ActRIIB tiene la tensión arterial elevada, entonces la dosificación con dichos uno o más antagonistas de la divulgación puede continuar al mismo nivel y un agente hipotensor se añade al régimen de tratamiento, la dosificación con el uno o más antagonistas de la divulgación puede reducirse (por ejemplo, la dosificación con uno o más antagonistas de la divulgación puede reducirse (por ejemplo, en cantidad y/o frecuencia) y añadirse un hipotensor a la pauta de tratamiento, o bien puede interrumpirse la dosificación con uno o más antagonistas de la divulgación y tratarse al paciente con un hipotensor.

Tal como se usa en el presente documento, "junto con", "combinaciones de" o administración "conjunta" se refiere a cualquier forma de administración, de modo que otros tratamientos (por ejemplo, segundo, tercero, cuarto, etc.) siguen siendo eficaces en el cuerpo (por ejemplo, múltiples compuestos son simultáneamente eficaces en el paciente, lo que puede incluir efectos sinérgicos de esos compuestos). La eficacia puede no estar correlacionada con la concentración medible del agente en sangre, suero o plasma. Por ejemplo, los diferentes compuestos terapéuticos pueden administrarse en la misma formulación o en formulaciones separadas, ya sea de forma concomitante o secuencial, y en diferentes horarios. Así, un individuo que reciba un tratamiento de este tipo puede beneficiarse de un efecto combinado de diferentes tratamientos. Uno o más antagonistas de ActRIIB, o combinaciones de tales polipéptidos, de la divulgación pueden administrarse simultáneamente, antes o después de uno o más agentes adicionales o tratamientos de apoyo. En general, cada agente terapéutico se administrará en una dosis y/o a un horario determinado para ese agente concreto. La combinación concreta que se va a emplear en una pauta posológica tendrá en cuenta la compatibilidad del antagonista de la presente divulgación con el tratamiento y/o lo deseado.

5. Composiciones farmacéuticas

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento (por ejemplo, el antagonista de ActRIIB) pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Por lo general, estas formulaciones estarán prácticamente exentas de pirógenos, de conformidad con la mayoría de los requisitos reglamentarios.

El procedimiento terapéutico puede incluir la administración de la composición sistémica o localmente en forma de un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta divulgación está en una forma fisiológicamente aceptable y sin pirógenos. Algunos agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de la transducción de señales de ActRIIB que también pueden incluirse opcionalmente en la composición descrita anteriormente pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos en cuestión (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB) en los procedimientos descritos en el presente documento.

Generalmente, los agentes terapéuticos de proteínas divulgados en el presente documento se administrarán por vía parenteral, y en especial, por vía intravenosa o subcutánea. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más antagonistas de ActRIIB junto con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes espesantes o de suspensión. Algunos ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones y formulaciones, si se desea, pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contengan el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración.

Además, la composición puede ser encapsulada o inyectada en una forma para el suministro a un sitio de tejido diana. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB) a un sitio de tejido diana, proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta del antagonista de ActRIIB. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de la interfase. La aplicación concreta de las composiciones en cuestión definirá la formulación adecuada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio biodegradable y químicamente definido, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, poli(ácido láctico) y polianhídridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como el hueso o el colágeno dérmico. Otras matrices se componen de proteínas puras o de componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son las que no son biodegradables ni químicamente definidas, tales como la hidroxiapatita sinterizada, el biovidrio, los aluminatos u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados, tal como poli(ácido láctico) e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. La biocerámica puede alterarse en su composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato, y procesarse para alterar el tamaño de los poros, el tamaño de las partículas, la forma de las partículas y la biodegradabilidad.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o en forma de un elixir o jarabe, o en forma de pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o en forma de colutorios y similares, conteniendo cada uno de ellos una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también puede administrarse en forma de píldora grande, electuario o pasta.

En formas farmacéuticas sólidas para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención pueden mezclarse con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio,

almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la disolución, tales como parafina; (6) acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y sus mezclas; y (10) colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura utilizando excipientes, tales como la lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

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

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

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

Se entiende que la pauta posológica será determinada por el médico tratante considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos de la invención en cuestión (por ejemplo, polipéptidos de T β RII). Los diversos factores incluyen, entre otros, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de la enfermedad, el momento de la administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosis puede variar en función del tipo de matriz utilizada en la reconstitución y los tipos de compuestos de la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosis. El avance puede controlarse mediante evaluaciones periódicas del crecimiento y/o la reparación ósea, por ejemplo, radiografías (incluida la DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

En el presente documento también se describe, pero no se reivindica, la terapia génica para la producción *in vivo* del antagonista de ActRIIB. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias polinucleotídicas de ActRIIB en células o tejidos que padezcan los trastornos enumerados anteriormente. La administración de secuencias polinucleotídicas de ActRIIB puede lograrse utilizando un vector de expresión recombinante, al como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la administración terapéutica de secuencias polinucleotídicas de ActRIIB se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

Diversos vectores virales que pueden ser utilizados para la terapia génica como se indica en el presente documento incluyen adenovirus, herpesvirus, virus variolovacunal o, preferentemente, un virus de ARN, tal como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Algunos ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un único gen extraño son, entre otros: 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). Otros vectores retrovirales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable, de modo que puedan identificarse y generarse células transducidas. Los vectores retrovirales pueden convertirse en específicos para diana al unirles, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La orientación a diana preferida se consigue utilizando un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que pueden insertarse secuencias polinucleotídicas específicas en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir el transporte específico de diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido de ActRIIB. El vector puede dirigirse al hueso o al cartílago.

Como alternativa, las células de cultivo tisular pueden transfectarse 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.

Otro sistema de transporte dirigido para polinucleótidos de antagonistas de ActRIIB es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas,

esferas y sistemas basados en lípidos, tales como emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas artificiales de membrana útiles como vehículos de transporte *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse en el interior acuoso y suministrarse a las células en forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los procedimientos para la transferencia eficiente de genes utilizando un vehículo liposomal son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, normalmente junto con esteroides, en especial colesterol. También pueden utilizarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

- 10 Algunos ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos. Entre los fosfolípidos ilustrativos se encuentran la fosfatidilcolina de huevo, la dipalmitoilfosfatidilcolina y la diestearyl fosfatidilcolina. El transporte dirigido de los liposomas también puede basarse, por ejemplo, en la especificidad de órgano, de célula o de orgánulo, y es conocida en la técnica.
- 15 La divulgación proporciona formulaciones que pueden variarse para incluir ácidos y bases para ajustar el pH; y agentes tamponantes para mantener el pH dentro de un estrecho intervalo.

Ejemplos

La invención que se está describiendo en términos generales será entendida más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen simplemente para ilustrar determinadas realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

20

Ejemplo 1: Generación de proteínas de fusión de ActRIIB-Fc

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

- 25 A continuación se muestra ActRIIB-hFc purificado a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 24):

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGO
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Las proteínas de ActRIIB-hFc y ActRIIB-Fc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes: (i) Melitina de abeja melífera ("honey bee mellitin", HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 21), (ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 22), y (iii) Nativo: MGAAAKLFAVFLISCSGA (SEQ ID NO: 23).

30

La forma seleccionada emplea el líder DE TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar (SEQ ID NO: 25):

MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 26):

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

La secuenciación N-terminal del material producido por células CHO reveló una secuencia principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 27). Cabe señalar que otras construcciones recogidas en la bibliografía comienzan con una secuencia-SGR....

La purificación podría lograrse mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluidas, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Sepharose Q, cromatografía de fenilSepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón.

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

Los solicitantes generaron una serie de mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB y produjeron estas proteínas mutantes en forma de proteínas de fusión solubles entre ActRIIB extracelular y un dominio Fc. El trasfondo de la fusión de ActRIIB-Fc tiene la secuencia de SEQ ID NO: 24.

Se introdujeron diversas mutaciones, incluidos truncamientos N- y C-terminales, en el trasfondo de la proteína ActRIIB-Fc. Basándose en los datos presentados en el presente documento, se prevé que estas construcciones, si se expresan con un líder de TPA, carezcan de la serina N-terminal. Se generaron mutaciones en el dominio extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Tras la PCR, los fragmentos se purificaron mediante una columna Qiagen, se digirieron con SfoI y AgeI y se purificaron en gel. Estos fragmentos se ligaron al vector de expresión pAID4 (véase el documento WO2006/012627) de tal forma que, al ligarse, se creaba una quimera de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en *E. coli* DH5 alfa, se escogieron las colonias y se aisló el ADN. Para las construcciones murinas (mFc), se substituyó la IgG1 humana por una IgG2a murina. Se verificaron las secuencias de todos los mutantes.

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

Los mutantes se purificaron utilizando diferentes técnicas, incluidas, por ejemplo, una columna de proteína A, y se eluyeron con tampón de glicina de pH bajo (3.0). Tras la neutralización, se dializaron contra PBS.

También se produjeron mutantes en células CHO mediante una metodología similar. Los mutantes se sometieron a los ensayos de unión y/o bioensayos descritos en los documentos WO 2008/097541 y WO 2006/012627. En algunos casos, los ensayos se realizaron con medio condicionado en lugar de proteínas purificadas. Otras variantes de ActRIIB se describen en la patente de EE. UU. n.º 7 842 663.

El solicitante generó una proteína de fusión de ActRIIB(25-131)-hFc, que comprende el dominio extracelular de ActRIIB humana con truncamientos N-terminal y C-terminal (residuos 25-131 de la proteína nativa de SEQ ID NO: 1) fusionado N-terminalmente con una secuencia líder de TPA sustituida por la líder de ActRIIB nativa y C-terminalmente con un dominio Fc humano a través de un conector mínimo (tres residuos de glicina) (figura 12). En la figura 13 se muestra una secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína de fusión. Los solicitantes modificaron los codones y encontraron una variante de ácido nucleico que codifica la proteína ActRIIB(25-131)-hFc que proporcionó una mejora sustancial en los niveles de expresión de los transformantes iniciales (figura 14).

La proteína madura tiene la secuencia de aminoácidos siguiente (el N-terminal se confirmó mediante secuenciación N-terminal) (SEQ ID NO: 28):

ETRECIYYNA NWELERTNQSG LERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
TYEPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
 WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKG FYPVDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK

Los aminoácidos 1-107 proceden de ActRIIB.

La molécula expresada se purificó utilizando una serie de etapas de cromatografía en columna, incluidas, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Sepharose Q, cromatografía de fenilSepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón.

Las afinidades de varios ligandos por ActRIIB(25-131)-hFc y su homólogo de longitud completa ActRIIB(20-134)-hFc se evaluaron *in vitro* con un instrumento Biacore™, y los resultados se resumen en la tabla siguiente. Los valores de K_d se obtuvieron por ajuste de afinidad en estado estacionario debido a la rapidísima asociación y disociación del complejo, que impidió la determinación precisa de k_{on} y k_{off}. ActRIIB(25-131)-hFc se unió a la activina A, la activina B y GDF11 con alta afinidad.

Afinidades de ligando de las formas de ActRIIB-hFc:

Construcción de fusión	Activina A (e-11)	Activina B (e-11)	GDF11 (e-11)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1

Ejemplo 2: Generación de una trampa de GDF

Los solicitantes construyeron una trampa de GDF de la siguiente manera. Un polipéptido que tiene un dominio extracelular modificado de ActRIIB (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución L79D) con una unión a activina A muy reducida en relación con GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución de leucina a aspartato en la posición 79 en SEQ ID NO: 1) se fusionó a un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo

- 5 (tres aminoácidos de glicina) entre ambos. Las construcciones se denominan ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 20-134)-Fc, respectivamente. Las formas alternativas con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 se comportaron de forma similar (L79E). También se generaron formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a SEQ ID NO: 44, a continuación, y actuaron de forma equivalente en todos los aspectos ensayados. El aspartato en la posición 79 (en relación con SEQ ID NO: 1, o la posición 60 en relación con SEQ ID NO: 29) se indica a continuación con subrayado doble. La valina en la posición 226 en relación con SEQ ID NO: 29 también se indica con subrayado doble a continuación.

A continuación, se muestra la trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, purificada a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 29).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGO
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

La porción derivada de ActRIIB de la trampa de GDF tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 30), y esa porción podría utilizarse como monómero o como proteína de fusión sin Fc en forma de monómero, dímero o complejo de orden mayor.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
 APT (SEQ ID NO: 30)

- 15 La proteína trampa de GDF se expresó en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

(i) Melitina de abeja melífera (HBML), (ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA), y (iii) Nativo.

La forma seleccionada emplea el líder de TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar:

MDAMKRGCLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31)

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 32):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA

GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
 GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
 ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGGAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA
 CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG
 TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 AAATGA

La purificación podría lograrse mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluidas, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Sepharose Q, cromatografía de fenilSepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón. En un ejemplo de esquema de purificación, el medio de cultivo celular se hace pasar por una columna de proteína A, se lava en Tris 150 mM/NaCl (pH 8,0), luego se lava en Tris 50 mM/NaCl (pH 8,0) y se eluye con glicina 0,1 M, pH 3,0. El eluido de pH bajo se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos como etapa de depuración viral. A continuación, el eluido se neutraliza y se pasa por una columna de intercambio iónico de Q-Sepharose y se lava en Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, y se eluye en Tris 50 mM, pH 8,0, con una concentración de NaCl entre 150 mM y 300 mM. A continuación, el eluido se cambia a Tris 50 mM, pH 8,0, sulfato de amonio 1,1 M y se pasa por una columna de fenilSepharose, se lava y se eluye en Tris 50 mM, pH 8,0 con sulfato de amonio entre 150 y 300 mM. El eluido se dializa y se filtra para su uso.

Otras trampas de GDF (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la proporción de unión a la activina A en relación con la unión a miostatina o GDF 11) se describen en los documentos WO 2008/097541 y WO 2006/012627.

Ejemplo 3: Bioensayo de transducción de señales mediada por GDF-11 y activina

Se utilizó un ensayo de gen indicador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF sobre la transducción de señales por GDF-11 y activina A. Línea celular: rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector indicador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Denninger *et al.*, 1998, EMBO, 17: 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente en genes que responden al TGF-beta (por ejemplo, el gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para factores que realizan la transducción de señales a través de SMAD2 y 3.

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

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

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

A continuación se realiza un ensayo de luciferasa. En ausencia de inhibidores, la activina A mostró una estimulación 10 veces superior de la expresión del gen indicador y una DE50 de aproximadamente 2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces mayor, DE50: aproximadamente 1,5 ng/ml.

- 5 ActRIIB(20-134) es un potente inhibidor de la actividad de la activina A, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. Como se describe más adelante, las variantes de ActRIIB también se sometieron a este ensayo.

Ejemplo 4: Actividad en células de variantes de ActRIIB-Fc

- 10 La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF se sometió a un ensayo en células como se ha descrito anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla siguiente. Algunas variantes se ensayaron en diferentes construcciones de truncamiento C-terminal. Como se ha comentado anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos provocaron una reducción de la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de la inhibición de la activina A, mientras que conservaron una inhibición de GDF-11 casi de tipo salvaje.

Unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF11 y activina A:

Variaciones de ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de SEQ ID NO:1)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de la activina
R64	20-134	+++ (aprox. 10^{-8} M K_i)	+++ (aprox. 10^{-8} M K_i)
A64	20-134	+ (aprox. 10^{-6} M K_i)	+ (aprox. 10^{-6} M K_i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ Actividad baja (aproximadamente 1×10^{-6} K_i)			
++ Actividad moderada (aproximadamente 1×10^{-7} K_i)			
+++ Actividad buena (tipo salvaje) (aproximadamente 1×10^{-8} K_i)			
++++ Actividad superior al tipo salvaje			

Se ha evaluado la semivida sérica de varias variantes en ratas. ActRIIB(20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 100-150 horas. Cualquiera de las variantes ensayadas anteriormente puede combinarse con las moléculas trampa de GDF.

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

- 5 La unión de determinadas proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF a ligandos se sometió a un ensayo Biacore™.

Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína de tipo salvaje se capturaron sobre el sistema utilizando un anticuerpo anti-hFc. Se inyectaron ligandos que fluyeron sobre las proteínas receptoras capturadas. Los resultados se resumen en las tablas siguientes.

Especificidad de unión al ligando de variantes de IIB.

GDF11			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
GDF8			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
Activina A			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11

ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Unión baja
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Unión baja
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

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

Se han generado y ensayado otras variantes, como se notifica en el documento WO2006/012627 . Véanse, por ejemplo, págs. 59-60, donde se emplean ligandos acoplados al dispositivo y se hace fluir el receptor sobre los ligandos acoplados. Cabe señalar que K74Y, K74F, K74I (y probablemente otras sustituciones hidrófobas en K74, tal como K74L) y D80I provocan una disminución de el cociente entre la unión a la activina A (ActA) y la unión a GDF11, en relación con la molécula K74 de tipo salvaje. A continuación, se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes: grandal pg 69

Unión de las variantes solubles de ActRIIB-Fc a GDF11 y activina A (ensayo Biacore™)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD = 1,8e-7M (+)	KD = 2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD = 8,6e-8M (+++)
+15cola	KD aprox. 2,6 e-8M (+++)	KD = 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD = 4,35e-9 M	KD = 5,3e-9M
K74Y	*	-
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*

ActRIIB	ActA	GDF11
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-
* No se observa unión -- <1/5 de unión WT - aprox. 1/2 de unión WT + WT ++ <2x aumento de la unión +++ aprox. 5x aumento de la unión ++++ aprox. 10x aumento de la unión +++++ aprox. 40x aumento de la unión		

Ejemplo 6: Generación de una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado

5 Se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB(L79D 20-134)-hFc mediante la fusión N-terminal del líder de TPA con el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en SEQ ID NO:1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en SEQ ID NO:1) y la fusión C-terminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (figura 3). En la figura 4 se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión.

10 Se generó una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado, denominada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, mediante la fusión N-terminal del líder de TPA con el dominio extracelular truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO:1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 de SEQ ID NO:1) y la fusión C-terminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (figura 5, SEQ ID NO: 50). Una secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína de fusión se muestra en la figura 6 (SEQ ID NO: 51), y en la figura 9 se muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente la misma proteína de fusión (SEQ ID NO: 55).

15 Ejemplo 7: Unión selectiva de ligando Selectivo por la trampa de GDF con el dominio extracelular ActRIIB doblemente truncado

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

Selectividad por el ligando de las variantes de ActRIIB-hFc:

Construcción de fusión	Activina A (Kd e-11)	Activina B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290,0	62,1	7,4

La trampa de GDF con un dominio extracelular truncado, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, igualó o superó la selectividad por el ligando mostrada por la variante más larga, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, con una pérdida pronunciada de la unión a activina A, una pérdida parcial de la unión a activina B, y la retención casi completa de la unión a GDF11 en comparación con los homólogos de ActRIIB-hFc que carecen de la sustitución L79D. Obsérvese que el truncamiento por sí solo (sin la sustitución L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos mostrados en este caso [compárese ActRIIB(L79 25-131)-hFc con ActRIIB(L79 20-134)-hFc]. ActRIIB(L79D 25-131)-hFc también mantiene una unión de fuerte a intermedia al ligando de transducción de señales de Smad 2/3 GDF8 y a los ligandos de Smad 1/5/8 BMP6 y BMP10.

10 Ejemplo 8: Trampa de GDF derivada de ActRIIB5

Otros autores han expuesto una forma alternativa y soluble de ActRIIB (denominada ActRIIB5), en la que el exón 4, que incluye el dominio transmembrana de ActRIIB, ha sido sustituido por una secuencia C-terminal diferente (véase, por ejemplo, el documento WO 2007/053775).

La secuencia de ActRIIB5 humana nativa sin su líder es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLD¹DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE (SEQ ID NO: 33)

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

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCW¹DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE (SEQ ID NO: 34)

Esta variante puede conectarse al Fc humano (subrayado doble) con un conector TGGG (subrayado simple) para generar una proteína de fusión de ActRIIB5(L79D)-hFc humana con la siguiente secuencia:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYN
STYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGOPENNYKTTTPVLDSDGSEELY
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSEELY
SKLTVDKSRWQOGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35).

Esta construcción puede expresarse en células CHO.

Ejemplo 9: Efecto de una trampa de GDF en un modelo animal JAK2V617F

Se utilizaron ratones mutantes JAK2V617F transgénicos [la línea A descrita en Xing *et al.* (2008), Blood, 111: 5109-5117] para comprender los efectos de ActRIIB(L79D 25-131)-Fc en la mielofibrosis.

Para comprender el inicio y la progresión de la enfermedad de la mielofibrosis, se compararon los recuentos sanguíneos completos y el grado de fibrosis en ratones *JAK2V617F*, en diferentes edades, con los datos obtenidos de animales de control (ratones de tipo salvaje equiparados por edad). Los niveles de glóbulos rojos ("red blood cell", RBC) y plaquetas eran elevados en los ratones *JAK2V617F* en todas las edades en comparación con los de tipo salvaje, con una tendencia al aumento de los niveles en los animales mutantes entre los 2 y los 5 meses, seguida de un descenso progresivo entre los 8 y los 12 meses. Se detectó fibrosis en la médula ósea de los ratones *JAK2V617F* a partir de los 5 meses, que empeoró con la edad. Los ratones *JAK2V617F* también mostraron esplenomegalia alrededor de los 3 o 4 meses, que también empeoró con la edad.

Para el estudio de la trampa de GDF, el tratamiento se inició a los 12 meses de edad, lo que corresponde a la fase tardía de la mielofibrosis. Los ratones fueron colocados en uno de dos grupos: i) tratamiento de ratones *JAK2V617F* con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc en una pauta de administración de 10 mg/kg dos veces por semana; y ii) tratamiento de ratones *JAK2V617F* con vehículo (TBS) dos veces por semana (es decir, animales de control). Tras 10 semanas, los animales tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc mostraron una reducción del tamaño del bazo (-12,5 %) en comparación con los animales de control. En consonancia con esta observación, la histopatología reveló una disminución de la hematopoyesis extramedular en los bazo de los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc en comparación con los animales de control. La histopatología también mostró una disminución de la fibrosis de la médula ósea en los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc en comparación con los animales de control.

En consecuencia, el tratamiento con una trampa de GDF es eficaz para mejorar diversas complicaciones de la mielofibrosis en este modelo *JAK2V617F*, especialmente en la disminución de la esplenomegalia, la hematopoyesis extramedular y la fibrosis. Así pues, estos datos indican que los antagonistas de ActRIIB pueden utilizarse para tratar la mielofibrosis. Por ejemplo, los antagonistas de ActRIIB pueden ser especialmente útiles en el tratamiento de diversas complicaciones de la mielofibrosis, incluidas, por ejemplo, la disminución de la esplenomegalia, la disminución de la hematopoyesis extramedular, el aumento de los niveles de glóbulos rojos y/o la disminución de la fibrosis (por ejemplo, la fibrosis de la médula ósea).

Ejemplo 10: Efecto de una trampa de GDF en animales tratados con ruxolitinib

El ruxolitinib es un inhibidor de la cinasa Janus que ha sido aprobado para el tratamiento de la mielofibrosis de riesgo intermedio o alto. En concreto, el ruxolitinib muestra efectos significativos en la reducción del tamaño del bazo y la mejora de los síntomas asociados a la esplenomegalia en pacientes con mielofibrosis. Sin embargo, se han observado diversos efectos secundarios hematológicos en pacientes tratados con ruxolitinib, como, por ejemplo, anemia. Se utilizaron ratones C57BL/6 de nueve meses de edad para comprender los efectos del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc sobre diversos parámetros hematológicos en ratones tratados con ruxolitinib.

Para este estudio, el tratamiento se inició a los 6-7 meses de edad. Los ratones se situaron en uno de los cuatro grupos siguientes: i) tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc en dosis de 10 mg/kg dos veces por semana; ii) tratamiento con ruxolitinib en dosis de 60 mg/kg dos veces por día; iii) tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc en dosis de 10 mg/kg dos veces por semana y ruxolitinib en dosis de 60 mg/kg dos veces por día; y iv) tratamiento con vehículo (TBS) dos veces por semana (es decir, animales de control). Tras cuatro semanas de tratamiento, se observó que los ratones ActRIIB(L79D 25-131)-Fc presentaban un aumento de los niveles de glóbulos rojos (-15 %) y hemoglobina (-13 %) en comparación con los ratones de control (tratados con TBS), lo que demuestra que ActRIIB(L79D 25-131)-Fc aumenta la actividad eritropoyética en ratones C57BL/6. Por el contrario, el tratamiento con ruxolitinib provocó una disminución de los niveles de glóbulos rojos (-4 %) y hemoglobina (aproximadamente un 4 %) en comparación con los animales de control. Los ratones tratados conjuntamente con ActRIIB(L79D 25-131)-Fc y ruxolitinib mostraron un aumento de los niveles de glóbulos rojos (-8 %) y hemoglobina (aproximadamente un 5 %) en comparación con los animales de control.

Estos datos demuestran que ActRIIB(L79D 25-131)-Fc puede revertir la anemia inducida por ruxolitinib en ratones normales y sanos. Por lo tanto, los datos sugieren que los antagonistas de ActRIIB pueden ser útiles para aliviar la anemia inducida por inhibidores de la cinasa Janus en diversas poblaciones de pacientes, incluidos, por ejemplo, los pacientes con mielofibrosis que han estado o están en tratamiento con uno o más inhibidores de la cinasa Janus. En consecuencia, los antagonistas de ActRIIB pueden ser útiles como parte de un tratamiento conjunto con inhibidores de la cinasa Janus para tratar una diversidad de poblaciones de pacientes que incluyen, por ejemplo, pacientes con mielofibrosis que han estado o están en tratamiento con uno o más inhibidores de la cinasa Janus, especialmente aquellos que presentan anemia.

Aunque se han analizado realizaciones específicas de la materia objeto, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones a continuación. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones y la memoria descriptiva, junto con tales variaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la mielofibrosis o una o más complicaciones de la mielofibrosis en un paciente, en la que la composición comprende: a) un inhibidor de la cinasa Janus; y b) un antagonista de ActRIIB, en la que el inhibidor de la cinasa Janus y el antagonista de ActRIIB se administran en una cantidad eficaz, en la que el inhibidor de la cinasa Janus se selecciona del grupo que consiste en: ruxolitinib, fedratinib (SAR302503), monoelotinib (CYT387), pacritinib, lestaurtinib, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XLO19 y AT-9283, y en la que el antagonista de ActRIIB es un polipéptido de ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 % a una secuencia que comienza en un residuo correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 de SEQ ID NO: 1 y que termina en un residuo correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134 de SEQ ID NO: 1; y en la que el polipéptido de ActRIIB comprende un aminoácido ácido en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1, y en la que el polipéptido de ActRIIB inhibe GDF11 sin inhibir la activina A.
2. La composición para usar de la reivindicación 1, en la que la composición disminuye una o más de: fibrosis de médula ósea, fibrosis de bazo, fibrosis de hígado, fibrosis de pulmón y fibrosis de ganglios linfáticos.
3. La composición para usar de la reivindicación 1, en la que la composición aumenta los niveles de glóbulos rojos en el paciente y/o aumenta los niveles de hemoglobina en el paciente.
4. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el paciente padece anemia, y en la que la composición trata la anemia.
5. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que al paciente se le han administrado una o más transfusiones de células sanguíneas antes del inicio del tratamiento con el polipéptido de ActRIIB y/o en la que el paciente es dependiente de transfusiones de células sanguíneas; y en la que la composición para usar disminuye la carga de transfusiones de células sanguíneas en más de un 30 % durante 4 a 8 semanas en relación con el mismo tiempo antes del inicio del tratamiento con el polipéptido de ActRIIB.
6. La composición para usar de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el paciente padece mielofibrosis primaria, mielofibrosis posterior a policitemia vera y/o mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial.
7. La composición para usar de la reivindicación 1, en la que la mielofibrosis está asociada con una o más mutaciones en JAK2.
8. La composición para usar de la reivindicación 7, en la que la mutación de JAK2 es JAK2V617F.
9. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el paciente ha sido tratado con un inhibidor de la cinasa Janus y/o es intolerante a un inhibidor de la cinasa Janus.
10. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que al paciente se le administra además hidroxiurea, ha sido tratado previamente con hidroxiurea, es intolerante a la hidroxiurea y/o tiene una respuesta inadecuada a la hidroxiurea.
11. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polipéptido de ActRIIB se selecciona del grupo que consiste en:
 - a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1;
 - b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1;
 - c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 - d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 - e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

- f) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
- 5 g) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- h) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y
- 10 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.
12. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el polipéptido comprende un residuo de aspartato (D) en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.
- 15 13. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el polipéptido comprende un residuo de glutamato (E) en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.
14. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina, en la que el dominio Fc de inmunoglobulina es de un dominio Fc de IgG1, y en la que la proteína de fusión comprende además un dominio conector situado entre el polipéptido de ActRIIB y el dominio Fc de inmunoglobulina.
- 20 15. La composición para usar de la reivindicación 14, en la que el polipéptido es una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que comprende un polipéptido seleccionado de:
- a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;
- 25 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;
- 30 d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;
- e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;
- 35 f) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;
- 40 g) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;
- h) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y
- 45 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, un 75 % un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.
- 50 16. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el polipéptido de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 53.

17. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el polipéptido de ActRIIB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

ActRIIa	ILGRSETQEC	LEFNANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IVYNANWELE	RTNOSGLERC	EGEQDKRLHC	YASWRNSSGT
	IEIVKQGWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPPEM
	IELVKKGCWL	DDFNICYDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TPKPP			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

FIGURA 1

Ilb rata
Ilb cerdo
Ilb ratón
Ilb humana
Ilb bovina
Ilb *Xenopus*
IIA humana

10	MTAPWAA-LALLWGSSLCAGSGRGEAE	20	TR	30	CIYYNNANWEL	40	ERTNQSGLER	50	-CEGEQDKR
	MTAPWAA-LALLWGSSLCVSGSRGEAE		TR		CIYYNNANWEL		ERTNQSGLER		-CEGEQDKR
	MTAPWAA-LALLWGSSLCAGSGRGEAE		TR		CIYYNNANWEL		ERTNQSGLER		-CEGEQDKR
	MTAPWVA-LALLWGSSLCAGSGRGEAE		TR		CIYYNNANWEL		ERTNQSGLER		-CEGEQDKR
	MTAPWAAA-LALLWGSSLCAGSGRGEAE		TR		CIYYNNANWEL		ERTNQSGLER		-CEGERDKR
	MGASVALTFLLLATFRAGSGHDEVE		TR		CIYYNNANWEL		ERTNQSGLER		-CEGERDKR
	MGAACKLAFVFLISCSGAILGRSET		TR		CIYYNNANWEL		ERTNQSGLER		-CEGERDKR
	MtApwaaXllaIlwgsllcaGsglrg		ea		TrECiYYNANWEL		ERTNQSGLER		cegeqDKR

Consenso

Ilb rata
Ilb cerdo
Ilb ratón
Ilb humana
Ilb bovina
Ilb *Xenopus*
IIA humana

60	LHCYASWPNSSGTIELVKKGCWLDD	80	DFNCYDRQECVA	90	TEENFQVYFCCCEGNFC	100	NERFT	110	
	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT		
	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT		
	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT		
	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT		
	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT		
	LHCYAEWRNNSGFIELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT		
	RHCFATWKNISGSI		ELVKKGCWLDD		DFNCYDRQECVA		TEENFQVYFCCCEGNFC		NERFT
	LHCYASwrnsSGtIElVkkGCWLDD		DfNCYDRqeCvate		enPqVYFCCCEGNt		Cnerft		

Consenso

Ilb rata
Ilb cerdo
Ilb ratón
Ilb humana
Ilb bovina
Ilb *Xenopus*
IIA humana

120	HLPEPGGPPEVTYEP-PPTAPTLLT	130	VLAYSLLPIGGLS-	140		150	
	HLPEAGGPPEVTYEP-PPTAPTLLT		VLAYSLLPIGGLS-				
	HLPEPGGPPEVTYEP-PPTAPTLLT		VLAYSLLPIGGLS-				
	HLPEAGGPPEVTYEP-PPTAPTLLT		VLAYSLLPIGGLS-				
	HLPEAGGPPEVTYEP-PPTAPTLLT		VLAYSLLPIGGLS-				
	HLPEV--EETFDPKPQPASASVNL		ILYSLLPVGLSM				
	YFPMEV		TQPTSNP-VTPKPPYNNILYSLVPLMLI				
	hlpEXggppevTyepKpppta		ptlltvlaySLlPigglSM				

Consenso

FIGURA 2

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 45)

FIGURA 3

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
    TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
    CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
    GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
    CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
    CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGT'TGCT

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
    CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
    GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
    GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
    TGGGTTCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACCAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
    ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
    CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
    GTTGTCGTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
    CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
    CGGGGGTAGC TCTTTTGGA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

```

FIGURA 4A

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC
 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG
 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
 CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC
 1051 TAAATGA (SEQ ID NO: 48)
 ATTTACT (SEQ ID NO: 49)

FIGURA 4B

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)

FIGURA 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 E T R E C I Y Y
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT
 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
 TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG
 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
 CTTCCGCTCG TCCTGTTTCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC
 S G T I E L V K K G C W D D D F
 201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
 GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCTG CTACTGAAGT
 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
 TGACGATGCT ATCCGTCTCT ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC
 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
 ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA
 P E A G G P E V T Y E P P P T
 351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
 CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC
 401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGAATTGA GGACCCCCCT
 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
 501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCTTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC CTGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

FIGURA 6A

```

601  AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
      TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651  CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
      GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701  GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
      CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801  CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGAGC GACCAGTTTC

851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901  GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951  CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 51)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 52)

```

FIGURA 6B

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPRVTCV
151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 53)

FIGURA 7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT
101 HLPEAGGPEV TYEPPPT (SEQ ID NO: 54)

FIGURA 8

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                               E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGGC CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTATATTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGCTTTG GCGGCTTACA TAAATAATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101  ATGCTAAATTG GGAACCTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACCGGTGT
   TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151  GAGGGCGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCCCTCGT GGAGGCAACTC
   CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

S G T I E L V K K G C W D D D F
201  CTCCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTC
   GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251  ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
   TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301  TATTTCTGTT GTTGGAGGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
   ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTAAGTGCCA AATGGGTGGA

P E A G G P E V T Y E P P P T
351  CCCGGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCACCCGGTG
   GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401  GTGGAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCCGAG CACCTGAAGT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451  CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501  CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551  CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601  AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTACG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGATGG CACACCAGTC

651  CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

```

FIGURA 9A

```

701   GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
      CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751   AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 55)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO: 56)

```

FIGURA 9B

GAAAC CCGGAATGT ATTATATACA ATGCTAATTG GGAACCTGAA CGGACGAACC
 AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGAAC AGGATAAACG CCTOCATTGC TATGCCGTCT
 GGAGGAACTC CTCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTC
 ATTGTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
 GTTGCAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCGAAGCC GCGGGCCCG
 AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCQACC (SEQ ID NO: 57)

FIGURA 10

IgG1 -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53
 IgG4 ---ESKYGPPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF 57
 IgG2 -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51
 IgG3 EPKSCDTPPPCPRCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60
 ** **** . * *****:*****:*

IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
 IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
 IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
 IgG3 KWIYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
 :*****:***:*****:*****:***:****

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 173
 IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 177
 IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 171
 IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP 180
 :**:*****:*****:*****:***

IgG1 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
 IgG4 PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK 229
 IgG2 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
 IgG3 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNIFSCSVMEALHNRFYQKSLSLSPGK 232
 *:*****:*****:***:*****:***** **

FIGURA 11

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPOV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58)

FIGURA 12

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51  AGTCTTTCGTT TCGCCCGGGC A E T R E C I Y Y
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
   ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TGC GGTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

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

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

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

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

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

401 GTGGAAC TCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGT CAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTG CATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
   TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

```

FIGURA 13A

```

801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTTCCTGGT GCGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 59)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 60)

```

FIGURA 13B

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGC CCGCGGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT

 A E T R E C I Y Y
 101 ATGCTAATTG GGA⁺ACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGA⁺ACGGTGT
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTGGT GGAGGAATCT
 CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 201 CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACGATTTCA
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT

 S G T I E L V K K G C W L D D F
 251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
 TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 301 TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 351 CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCCAACGGTG
 GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

 P E A G G P E V T Y E P P P T
 401 GTGGA⁺ACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

 501 CCGGA⁺CCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

 601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

FIGURA 14A

```

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
    GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
    CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
    CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
    GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
    TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 61)
    GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 62)

```

FIGURA 14B