

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 650**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2015 PCT/US2015/026415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15161220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2015 E 15779814 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020 EP 3131931**

54 Título: **Procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y tratar la drepanocitosis**

30 Prioridad:

**18.04.2014 US 201461981519 P**

**25.04.2014 US 201461984393 P**

**12.06.2014 US 201462011482 P**

**11.08.2014 US 201462036066 P**

**05.12.2014 US 201462088374 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.07.2021**

73 Titular/es:

**ACCELERON PHARMA INC. (100.0%)**

**128 Sidney Street**

**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**KUMAR, RAVINDRA y**

**SURAGANI, NAGA VENKATA SAI, RAJASEKHAR**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 845 650 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

Procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y tratar la drepanocitosis

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a las solicitudes provisionales de los EE. UU. con n.º de serie 61/981 519, depositada el 18 de abril de 2014, 61/984 393, depositada el 25 de abril de 2014, 62/011 482, depositada el 12 de junio de 2014, 62/036 066, depositada el 11 de agosto de 2014 y 62/088 374, depositada el 5 de diciembre de 2014.

## ANTECEDENTES

La hematopoyesis es la formación de componentes celulares de la sangre a partir de células madre hematopoyéticas autorrenovables ubicadas principalmente en la médula ósea, el bazo o los ganglios linfáticos durante la vida posnatal. Las células sanguíneas se pueden clasificar como pertenecientes al linaje linfocítico, linaje mielocítico o linaje eritroide. Mediante un proceso conocido como linfopoyesis, las células progenitoras linfoides comunes dan lugar a linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales y células dendríticas. Mediante un proceso denominado mielopoyesis, las células progenitoras mieloides comunes dan lugar a macrófagos, granulocitos (basófilos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos) y trombocitos (plaquetas). Por último, mediante un proceso conocido como eritropoyesis, las células progenitoras eritroides dan lugar a glóbulos rojos (eritrocitos).

La eritropoyesis posnatal se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas vías de transducción de señales controla el equilibrio de la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celulares. En condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a una velocidad que mantiene una masa de glóbulos rojos constante en el cuerpo, y la producción puede aumentar o disminuir en respuesta a diversos estímulos, que incluyen tensión de oxígeno o demanda tisular aumentadas o disminuidas. El proceso de la eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras que han adquirido un compromiso de linaje y avanza a través de una serie de distintos tipos de células precursoras. Las etapas finales de la eritropoyesis se producen a medida que se liberan reticulocitos en la circulación sanguínea y pierden sus mitocondrias y ribosomas a la vez que adoptan la morfología de los glóbulos rojos maduros. Un nivel elevado de reticulocitos, o una relación elevada de reticulocito:eritrocito, en la sangre es indicativo de velocidades de producción de glóbulos rojos aumentadas. El glóbulo rojo (RBC) maduro es responsable del transporte de oxígeno en los aparatos circulatorios de los vertebrados. Los glóbulos rojos contienen concentraciones altas de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) relativamente alta y suministra oxígeno a áreas del cuerpo con  $pO_2$  relativamente baja.

La eritropoyetina (EPO) es ampliamente conocida como un regulador positivo importante de la eritropoyesis posnatal en vertebrados. La EPO regula la respuesta eritropoyética compensadora a la tensión de oxígeno tisular reducida (hipoxia) y a niveles de glóbulos rojos bajos o niveles de hemoglobina bajos. En los seres humanos, los niveles de EPO elevados favorecen la formación de glóbulos rojos estimulando la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En los ratones, la EPO mejora la eritropoyesis principalmente en el bazo.

Los efectos de la EPO están mediados por un receptor de la superficie celular que pertenece a la superfamilia de los receptores de citocinas. El gen del receptor de EPO humana codifica una proteína transmembranaria de 483 aminoácidos; sin embargo, se cree que el receptor de EPO activo existe como un complejo multimérico incluso en ausencia de ligando (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6 319 499). El receptor de EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamífero une EPO con una afinidad similar a la del receptor natural en células progenitoras eritroides. La unión de EPO a su receptor provoca un cambio conformacional que da como resultado la activación del receptor y efectos biológicos que incluyen proliferación de eritroblastos inmaduros aumentada, diferenciación de eritroblastos inmaduros aumentada y apoptosis en células progenitoras eritroides reducida [véase, p. ej., Liboi y col., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury y col., 1990, Science 248:378-381].

Los médicos usan diversas formas de EPO recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un abanico de entornos clínicos, particularmente en el tratamiento de la anemia. La anemia es una afección ampliamente definida caracterizada por niveles de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre inferiores a los normales. En algunos aspectos, la anemia es provocada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de los glóbulos rojos (p. ej., drepanocitosis). Más habitualmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas [véase, p. ej., Weatherall y Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175]. La anemia puede ser consecuencia de una velocidad de producción reducida o una velocidad de destrucción aumentada de los glóbulos rojos o de la pérdida de glóbulos rojos debido a hemorragia. La anemia puede ser consecuencia de un abanico de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal aguda o crónica o nefropatía terminal, tratamiento quimioterápico, un síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

El tratamiento con EPO provoca típicamente un aumento en la hemoglobina de aproximadamente 1-3 g/dL en seres



humanos sanos a lo largo de un periodo de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, esta pauta terapéutica proporciona a menudo aumentos sustanciales en los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos y conduce a mejoras en la calidad de vida y supervivencia prolongada. Sin embargo, la EPO no es efectiva de manera uniforme y muchos individuos son resistentes incluso a dosis altas [véase, p. ej., Horl y col. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 43-50]. Por ejemplo, más de 50 % de los pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la EPO y aproximadamente 10 % con nefropatía terminal son hiposensibles a la EPO [véase, p. ej., Glaspy y col. (1997) *J Clin Oncol* 15, 1218-1234; Demetri y col. (1998) *J Clin Oncol* 16, 3412-3425], y menos de 10 % con síndromes mielodisplásicos responden favorablemente a la EPO [véase, p. ej., Estey (2003) *Curr Opin Hematol* 10, 60-670]. Aunque los mecanismos moleculares de resistencia a la EPO siguen sin estar claros, varios factores, que incluyen inflamación, ferropenia e hipovitaminosis, diálisis inadecuada, toxicidad por aluminio e hiperparatiroidismo, pueden predecir una respuesta terapéutica deficiente. Además, los datos recientes sugieren que las dosis superiores de EPO pueden estar asociadas a un riesgo de morbilidad cardiovascular, crecimiento tumoral y mortalidad aumentado en algunas poblaciones de pacientes [véase, p. ej., Krapf y col. (2009) *Clin J Am Soc Nephrol* 4:470-480; Glaspy (2009) *Annu Rev Med* 60:181-192]. Por lo tanto, se ha recomendado que los compuestos terapéuticos a base de EPO (p. ej., agentes estimulantes de la eritropoyetina, ESA) se administren a la dosis mínima que permita evitar las transfusiones de glóbulos rojos a un paciente [véase, p. ej., Jelkmann y col., 2008, *Crit Rev Oncol. Hematol* 67:39-61].

La drepanocitosis es un trastorno sanguíneo hereditario caracterizado por glóbulos rojos que asumen una forma falciforme, rígida y anómala [véase, p. ej., Eaton y col. (1990) *Adv Protein Chem*, 40: 63-279; Steinberg, MH (1999) *N Engl J Med* 340(13): 1021-1030 y Ballas y col. (1992) *Blood*, 79(8) 2154-63]. Se cree que la pérdida de elasticidad de los glóbulos rojos es fundamental para la fisiopatología de la drepanocitosis. Los glóbulos rojos normales son bastante elásticos, lo que permite que los glóbulos rojos se deformen al pasar a través de los capilares. En la drepanocitosis, la tensión de oxígeno baja favorece la falciformación de los glóbulos rojos y los episodios repetidos de lesión por falciformación dañan la membrana celular y, por tanto, reducen la elasticidad de la célula. Asimismo, los drepanocitos a menudo no vuelven a una forma normal cuando se restablece la tensión de oxígeno normal. Como consecuencia, estas células sanguíneas rígidas son incapaces de deformarse a medida que pasan a través de capilares estrechos, lo que da como resultado (vaso)oclusión e isquemia. Asimismo, los drepanocitos son más propensos a hemólisis que los glóbulos rojos normales, lo que da como resultado una incidencia alta de anemia en sujetos con drepanocitosis.

La drepanocitosis está caracterizada por diversas complicaciones agudas y crónicas, que están asociadas a morbilidad y mortalidad significativas en el sujeto afectado [véase, p. ej., Kassim y col. (2013) *Annu Rev Med*, 64: 451-466]. Los términos "crisis drepanocítica" o "crisis de falciformación" se pueden usar para describir varias complicaciones agudas independientes que se producen en pacientes con drepanocitosis que incluyen, por ejemplo, crisis de dolor, crisis dolorosa, crisis de anemia, crisis vasooclusiva, crisis aplásica crisis, crisis de secuestro (p. ej., esplénico y/o hepático) y crisis hemolítica. Estas complicaciones de las crisis drepanocíticas están asociadas a una incidencia alta de, p. ej., accidente cerebrovascular, hipertensión pulmonar, síndrome torácico (agudo), esplenomegalia, sobrecarga de hierro, lesión de órganos, insuficiencia renal, anemia y necesidades de transfusión de sangre y tratamiento del dolor. Tales complicaciones contribuyen la esperanza de vida acortada y la morbilidad aumentada en sujetos con drepanocitosis.

Hay una gran necesidad insatisfecha de terapias efectivas para la drepanocitosis y sus complicaciones. Se ha observado que los niveles de EPO endógena son habitualmente elevados en pacientes con drepanocitosis [véase, p. ej., Dale y col. (1998) *Lancet*, 352: 566-567]. Por lo tanto, no es sorprendente que los agentes terapéuticos a base de EPO hayan tenido resultados mixtos en lo que respecta al tratamiento de la drepanocitosis. Por ejemplo, algunos pacientes parecen no ser sensibles a la EPO en lo que respecta al tratamiento de la anemia inducida por drepanocitos, particularmente los pacientes que padecen nefropatía terminal [véase, p. ej., Zumrutdal y col. (2010) *NDT Plus*, 3 (3): 328-330]. Asimismo, se ha observado que los agentes terapéuticos a base de EPO agravan otros aspectos de la drepanocitosis, tales como las crisis vasooclusivas (p. ej., lo que conduce a un aumento del dolor vasooclusivo y/o la hipertensión) [véase, p. ej., Little y col. (2006) *Haematologica*, 91 (8): 1076-1083].

Por tanto, un objetivo de la presente descripción es proporcionar procedimientos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o abordar otras complicaciones de la drepanocitosis.

## RESUMEN DE LA PRESENTE DESCRIPCIÓN

A este respecto, la presente descripción proporciona una composición para uso en un procedimiento para tratar o impedir una complicación de la drepanocitosis en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar la composición a un sujeto, donde la composición comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación se selecciona del grupo que consiste en crisis de dolor, vasooclusión y crisis vasooclusiva, donde el antagonista de ActRII comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición que corresponde a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1; donde el polipéptido se une a GDF8 y/o GDF11. En un aspecto, la complicación es crisis de dolor. En un aspecto, la complicación de la drepanocitosis es crisis vasooclusiva. En un aspecto, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el aminoácido ácido es un ácido glutámico o un ácido aspártico. En un aspecto, el aminoácido ácido es un ácido glutámico. En un



aspecto, el aminoácido ácido es un ácido aspártico. En un aspecto, el polipéptido es: un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 o que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la

5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45. En un aspecto, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45. En un aspecto, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En un aspecto, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende además uno o más dominios polipeptídicos heterólogos que mejoran una o más de: semivida *in vivo*, semivida *in vitro*, administración, ubicación o distribución tisular, formación de complejos proteicos y purificación, donde el dominio polipeptídico heterólogo se selecciona de

10 entre: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica. En un aspecto, el dominio Fc de inmunoglobulina: a) es un dominio Fc de IgG1; o b) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 15 o 16. En un aspecto, la proteína de fusión comprende además un dominio de enlazador situado entre el dominio polipeptídico y el dominio Fc de inmunoglobulina. En un aspecto, el polipéptido comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido

15 farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico. En un aspecto, el procedimiento comprende además administrar uno o más tratamientos complementarios para la drepanocitosis, donde el tratamiento complementario: a) es transfusión con glóbulos rojos; b) comprende la administración de un agente quelante de hierro o múltiples agentes quelantes de hierro; c) comprende la administración de eritropoyetina, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta,

20 epoetina omega, darbepoetina alfa o metoxi-polietilenglicol epoetina beta; y/o d) comprende la administración de hidroxiurea. En un aspecto, el tratamiento complementario comprende la administración de hidroxiurea.

En parte, la descripción proporciona procedimientos para tratar la drepanocitosis (SCD), particularmente para tratar o impedir una o más complicaciones de la SCD, con uno o más antagonistas de ActRII. Los antagonistas de ActRII de

25 la descripción incluyen, por ejemplo, agentes que pueden inhibir la activación mediada por un receptor ActRII (p. ej., un receptor ActRIIA y/o ActRIIB) de una vía de transducción de señales (p. ej., la activación de la transducción de señales a través de mediadores intracelulares, tales como SMAD 1, 2, 3, 5 y/u 8); agentes que pueden inhibir, p. ej., la unión a, y/o activación de, un receptor ActRII por uno o más ligandos de ActRII (p. ej., activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, BMP6, BMP7, Nodal, etc.); agentes que inhiben la expresión (p. ej.,

30 transcripción, traducción, secreción celular o combinaciones de las mismas) de un ligando de ActRII y/o un receptor ActRII; y agentes que pueden inhibir uno o más mediadores intracelulares de la vía de transducción de señales del ActRII (p. ej., SMAD 1, 2, 3, 5 y/u 8).

En algunos aspectos, la descripción se refiere a un antagonista de ActRII para uso en una composición para uso en

35 el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita. Según un aspecto, la descripción se refiere a un antagonista de ActRII para la fabricación de un medicamento para tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos, la descripción se refiere a un antagonista de ActRII para uso en una composición para uso en el tratamiento de una o más complicaciones de la drepanocitosis. Según un aspecto, la descripción se refiere a un antagonista de ActRII para la fabricación de un medicamento para tratar una o más complicaciones de la

40 drepanocitosis en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos, la descripción se refiere a un antagonista de ActRII para uso en una composición para uso en la prevención de una o más complicaciones de la drepanocitosis. Según un aspecto, la descripción se refiere a un antagonista de ActRII para la fabricación de un medicamento para impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita.

45 En particular, la descripción proporciona procedimientos para usar un antagonista de ActRII, o una combinación de antagonistas de ActRII, para tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis que incluyen, por ejemplo, anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar

50 falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro y complicaciones de la sobrecarga de hierro (p. ej., insuficiencia cardíaca congestiva, arritmia cardíaca, infarto de miocardio, otras formas de cardiopatía, diabetes sacarina, disnea, hepatopatía y efectos adversos de la terapia de quelación de hierro), infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular,

55 isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo. En algunos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para usar un antagonista de ActRII, o una combinación de antagonistas de ActRII, para tratar o impedir la oclusión vascular (vasooclusión) en un paciente con drepanocitosis que lo necesita, así como diversas complicaciones asociadas a la vasooclusión en un paciente con drepanocitosis (p. ej., crisis de vasooclusión, crisis de dolor, etc.). En algunos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para usar un

60 antagonista de ActRII, o una combinación de antagonistas de ActRII, para tratar o impedir la anemia en un paciente con drepanocitosis que lo necesita, así como diversas complicaciones asociadas a la anemia en un paciente con drepanocitosis (p. ej., crisis aplásica, crisis hiperhemolítica, etc.). En tales procedimientos, los antagonistas de ActRII se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos y a la vez reducir la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y/o terapia de quelación de hierro y reducir de ese modo la morbilidad y mortalidad asociadas a la acumulación

65 de hierro en tejidos/órganos vulnerables. En tales procedimientos, los antagonistas de ActRII también se pueden usar



para reducir la necesidad de otros tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis [p. ej., tratamiento con hidroxiaurea, tratamiento con una EPO u otro agonista de la EPO y/o tratamiento del dolor (p. ej., tratamiento con uno o más de agentes analgésicos opioides, antiinflamatorios no esteroideos y/o corticosteroides)]. En parte, los antagonistas de ActRII se pueden usar en combinación con tratamientos complementarios existentes para la drepanocitosis que incluyen, por ejemplo, transfusión de glóbulos rojos, terapia de quelación de hierro, terapia con hidroxiaurea, terapia con EPO o agonistas de la EPO y/o terapia de tratamiento del dolor. Opcionalmente, los antagonistas de ActRII de la descripción se pueden usar para reducir la cantidad, duración, etc., de un tratamiento complementario existente para la drepanocitosis. Por ejemplo, aunque la transfusión de glóbulos rojos y la terapia de quelación de hierro pueden ayudar a tratar ciertas complicaciones de la drepanocitosis, en ocasiones dan como resultado efectos secundarios adversos. Por lo tanto, en ciertos aspectos, los antagonistas de ActRII como se describen en esta solicitud se pueden usar para reducir la cantidad de un segundo tratamiento complementario, p. ej., reducir la carga de transfusión de células sanguíneas o reducir la dosis de un agente terapéutico de quelación. En ciertos aspectos, la descripción proporciona usos de un antagonista de ActRII, o una combinación de antagonistas de ActRII, (opcionalmente en combinación con uno o más tratamientos complementarios para la drepanocitosis) para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de la drepanocitosis, particularmente una o más complicaciones de la drepanocitosis como se describen en esta solicitud.

En parte, los ejemplos de la presente solicitud demuestran que los antagonistas de ActRII se pueden usar para aumentar diversos parámetros de los glóbulos rojos (p. ej., los niveles de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina, niveles de hematocrito, etc.) y tratar la anemia como consecuencia de diversos trastornos/afecciones. Los ejemplos de la descripción demuestran además que se puede usar un antagonista de ActRII para tratar la drepanocitosis. En particular, la descripción demuestra que una trampa de GDF (que comprende un dominio extracelular soluble de un polipéptido de ActRIIB que tiene un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1), cuando se administra *in vivo*, aumenta los niveles de glóbulos rojos en sujetos normales y sanos, así como en un modelo animal de drepanocitosis. Por consiguiente, los datos de esta solicitud indican que los antagonistas de ActRII se pueden usar para tratar o impedir la anemia en pacientes con drepanocitosis. Sorprendentemente, además de aumentar directamente los niveles de glóbulos rojos, los datos de la descripción indican que la trampa de GDF también mejora la morfología de los glóbulos rojos. Esta mejora observada en la morfología de los glóbulos rojos indica que la terapia con antagonistas de ActRII también se puede usar para tratar o impedir diversas complicaciones de la drepanocitosis distintas de la anemia que incluyen, por ejemplo, complicaciones derivadas de la oclusión vascular (también denominada vasooclusión). En algunos aspectos, estas complicaciones asociadas son de igual o mayor importancia para la salud y calidad de vida de pacientes con drepanocitosis que el estado anémico. En conjunto, estos datos indican, por lo tanto, que los antagonistas de ActRII de la presente descripción se pueden usar para tratar o impedir diversas complicaciones de la drepanocitosis que incluyen, por ejemplo, anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de sequestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, sequestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo.

En ciertos aspectos, los antagonistas de ActRII preferidos para ser usados según los procedimientos descritos en esta solicitud son agentes que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 y/o GDF8 (p. ej., un agente que inhibe la activación mediada por GDF11 y/o GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Tales agentes se denominan colectivamente antagonistas de GDF-ActRII. Opcionalmente, tales antagonistas de GDF-ActRII pueden inhibir además uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, BMP6, BMP7 y Nodal. Por lo tanto, en algunos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para usar uno o más antagonistas de ActRII, que incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIA solubles, polipéptidos de ActRIIB solubles, polipéptidos de trampa de GDF, anticuerpos anti-ActRIIA, anticuerpos anti-ActRIIB, anticuerpos antiligando del ActRII (p. ej., anticuerpos anti-GDF1, anticuerpos anti-GDF8, anticuerpos anti-activina A, anticuerpos anti-activina B, anticuerpos anti-activina AB, anticuerpos anti-activina C, anticuerpos anti-activina E, anticuerpos anti-BMP6, anticuerpos BMP7 y anticuerpos anti-Nodal), inhibidores de molécula pequeña de ActRIIA, inhibidores de molécula pequeña de ActRIIB, inhibidores de molécula pequeña de uno o más ligandos de ActRII (p. ej., activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, BMP6, BMP7, Nodal, etc.), nucleótidos inhibidores (inhibidores a base de nucleótidos) de ActRIIA, nucleótidos inhibidores de ActRIIB, nucleótidos inhibidores de uno o más ligandos de ActRII (p. ej., activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, BMP6, BMP7, Nodal, etc.), o combinaciones de los mismos, para aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o los niveles de hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita o tratar una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita. En ciertos aspectos, los antagonistas de ActRII que se van a usar según los procedimientos descritos en esta solicitud no se unen sustancialmente a, y/o inhiben, la activina A (p. ej., la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3).

En parte, la presente descripción demuestra que un antagonista de ActRII que comprende una variante del dominio



de ActRIIB extracelular (soluble) que se une a, e inhibe la actividad de, el GDF11 (p. ej., la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB mediada por GDF11, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3) se puede usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*, tratar la anemia como consecuencia de diversas afecciones/trastornos y tratar la drepanocitosis (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y mejorar la morfología de los glóbulos rojos en pacientes con drepanocitosis). Por lo tanto, en ciertos aspectos, los antagonistas de ActRII preferidos que se van a usar según los procedimientos descritos en esta solicitud (p. ej., procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, procedimientos para tratar la anemia en un sujeto que lo necesita, procedimientos para tratar la drepanocitosis, procedimientos para tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, etc.) son polipéptidos de ActRII solubles (p. ej., polipéptidos de ActRIIA o ActRIIB solubles) que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 (p. ej., la activación mediada por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Aunque los antagonistas de ActRIIA solubles y ActRIIB ActRII solubles pueden influir en la formación y/o morfología de los glóbulos rojos a través de un mecanismo diferente del antagonismo del GDF11, la descripción demuestra, no obstante, que se pueden seleccionar agentes terapéuticos deseables, en lo que respecta a los procedimientos descritos en esta solicitud, en base al antagonismo del GDF11 o al antagonismo de ActRII o ambos. Opcionalmente, tal antagonista de polipéptidos de ActRII solubles se puede unir además a, y/o inhibir, el GDF8 (p. ej., inhibir la activación mediada por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). En algunos aspectos, los polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB solubles de la descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 y/o GDF8 se pueden unir además a, y/o inhibir, uno o más ligandos de ActRII adicionales seleccionados de entre: activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona trampas de GDF que son variantes de polipéptidos de ActRIIB (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB), que incluyen polipéptidos de ActRII que tienen truncamientos amino- y carboxiterminales y/u otras alteraciones de la secuencia (una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones o combinaciones de las mismas). Opcionalmente, las trampas de GDF de la descripción se pueden diseñar para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores ActRII, tales como GDF8 (también denominado miostatina), GDF11, Nodal, BMP6 y BMP7 (también denominada OP-1). Como se describe en esta solicitud, los ejemplos de trampas de GDF incluyen un conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que tienen afinidad muy reducida por la activina, particularmente la activina A. Estas variantes presentan efectos deseables sobre los glóbulos rojos a la vez que reducen los efectos sobre otros tejidos. Los ejemplos de tales variantes incluyen aquellas que tienen un aminoácido ácido [p. ej., ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)] en la posición que corresponde a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1. En ciertos aspectos, las trampas de GDF preferidas para ser usadas según los procedimientos descritos en esta solicitud (p. ej., procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, procedimientos para tratar la anemia en un sujeto que lo necesita, procedimientos para tratar la drepanocitosis, procedimientos para tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, etc.) se unen a, y/o inhiben, el GDF11. Opcionalmente, tales trampas de GDF se pueden unir además a, y/o inhibir, el GDF8. En algunos aspectos, las trampas de GDF que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 y/o GDF8 se pueden unir además a, y/o inhibir, uno o más ligandos de ActRII adicionales (p. ej., activina B, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal). En ciertos aspectos, las trampas de GDF que se van a usar según los procedimientos descritos en esta solicitud no se unen sustancialmente a, y/o inhiben, la activina A (p. ej., la activación mediada por activina A de la transducción de señales del ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). En ciertos aspectos, un polipéptido de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37, 41, 44, 45, 50 o 51 y polipéptidos que son al menos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores. En otros aspectos, un polipéptido de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 22, 26, 28, 29, 31 o 49 y polipéptidos que son al menos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores. En otros aspectos más, un polipéptido de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 29, 31 o 49 y polipéptidos que son al menos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores, donde la posición que corresponde a la 79 de la SEQ ID NO: 1, 4 o 50 es un aminoácido ácido. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRII natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 o 49 o una secuencia de SEQ ID NO: 2, 5, 10, 11 o 49 que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 carboxiterminales y que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5 en el extremo amínico. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento con respecto a la SEQ ID NO: 2 o 5 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo amínico y de no más de 3 aminoácidos en el extremo carboxílico. Una trampa de GDF preferida para uso en tal preparado consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando de ActRII alterado tiene una relación de  $K_d$  para la unión a activina A a  $K_d$  para la unión a GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces superior con respecto a la relación para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de  $CI_{50}$  para inhibir la activina A a  $CI_{50}$  para inhibir el GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 o incluso 1000 veces superior con respecto al dominio de unión a ligando de ActRII de tipo natural. Opcionalmente, la trampa



de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado inhibe el GDF8 y/o GDF11 con una  $CI_{50}$  al menos 2, 5, 10, 20, 50 o incluso 100 veces inferior a la  $CI_{50}$  para inhibir la activina A. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo natural o mutante). En ciertos casos, las trampas de GDF solubles objetivo son antagonistas (inhibidores) del GDF8 y/o GDF11.

5

En ciertos aspectos, la descripción proporciona trampas de GDF que son polipéptidos de ActRIIB solubles que comprenden un dominio de unión a ligando (p. ej., de unión a GDF11) alterado. Las trampas de GDF con dominios de unión a ligando alterados pueden comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en residuos de aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es con respecto a la SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener selectividad aumentada por un ligando tal como GDF8/GDF11 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. A modo ilustrativo, se demuestra en esta solicitud que estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado por el GDF11 (y, por lo tanto, presumiblemente, por el GDF8) sobre la activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E y D80I. Las mutaciones siguientes tienen el efecto inverso, aumentan la relación de unión a activina sobre el GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión general (GDF11 y activina) se puede aumentar mediante la inclusión de la región de "cola" o, presumiblemente, de una región de enlazador desestructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que provocaron una reducción general en la afinidad de unión a ligando incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se pueden combinar para conseguir los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que influyen en la relación de unión a GDF11:activina tienen un efecto negativo general sobre la unión a ligando y, por lo tanto, se pueden combinar con mutaciones que generalmente aumentan la unión a ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad por el ligando. En un aspecto ejemplar, una trampa de GDF es un polipéptido de ActRIIB que comprende una mutación L79D o L79E, opcionalmente, en combinación con sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos adicionales.

25

En ciertos aspectos, los antagonistas de ActRII que se van a usar según los procedimientos descritos en esta solicitud son polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB. En general, tales polipéptidos de ActRIIB y polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB son polipéptidos solubles que comprenden una porción/un dominio derivados de la secuencia de ActRIIB de SEQ ID NO: 1, 4 o 49, particularmente una porción/un dominio extracelular de unión a ligando derivados de la secuencia de ActRIIB de SEQ ID NO: 1, 4 o 49. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a la secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 21-29 (p. ej., 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO:1 o 4 [que comienza opcionalmente en el 22-25 (p. ej., 22, 23, 24 o 25) de la SEQ ID NO:1 o 4] y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 109-134 (p. ej., 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 la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 20-29 (p. ej., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO: 1 o 4 [que comienza opcionalmente en el 22-25 (p. ej., 22, 23, 24 o 25) de la SEQ ID NO:1 o 4] y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 109-133 (p. ej., 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 20-24 (p. ej., 20, 21, 22, 23 o 24) de la SEQ ID NO: 1 o 4 [que comienza opcionalmente en el 22-25 (p. ej., 22, 23, 24 o 25) de la SEQ ID NO:1 o 4] y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 109-133 (p. ej., 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 21-24 (p. ej., 21, 22, 23 o 24) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 109-134 (p. ej., 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 la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 20-24 (p. ej., 20, 21, 22, 23 o 24) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 118-133 (p. ej., 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunas realizaciones, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 21-24 (p. ej., 21, 22, 23 o 24) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 118-134 (p. ej., 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 20-24 (p. ej., 20, 21, 22, 23 o 24) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 128-133 (p. ej., 128, 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 (p. ej., 20, 21, 22, 23 o 24) de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 (p. ej., 128, 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 39. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 21-29 (p. ej., 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 118-134 (p. ej., 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 20-29 (p. ej., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 118-133 (p. ej., 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131,



132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 21-29 (p. ej., 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 128-134 (p. ej., 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de la SEQ ID NO: 1 o 4. En algunos aspectos, la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en uno cualquiera de los aminoácidos 20-29 (p. ej., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en uno cualquiera de los aminoácidos 128-133 (p. ej., 128, 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1 o 4. Sorprendentemente, las construcciones de ActRIIB y de trampa de GDF a base de ActRIIB que comienzan en el 22-25 (p. ej., 22, 23, 24 o 25) de la SEQ ID NO: 1 o 4 tienen niveles de actividad superiores a las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. En un aspecto preferido, los polipéptidos de ActRIIB y los polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 1 o 4 y que termina en la posición de aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 1 o 4. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores puede comprender además una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de los polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores puede comprender un aminoácido ácido en la posición que corresponde a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a la SEQ ID NO: 1. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores, que incluyen homodímeros y/o proteínas de fusión de los mismos, se pueden unir a, y/o inhibir la transducción de señales por, la activina (p. ej., activina A, activina B, activina C o activina AB) en un ensayo a base de células. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores, que incluyen homodímeros y/o proteínas de fusión de los mismos, se pueden unir a, y/o inhibir la transducción de señales por, el GDF11 y/o GDF8 en un ensayo a base de células. Opcionalmente, cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores, que incluyen homodímeros y/o proteínas de fusión de los mismos, se pueden unir a, y/o inhibir la transducción de señales de, una o más de activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal en un ensayo a base de células.

Se contemplan otros polipéptidos de ActRIIB y polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB, tales como los siguientes. Un polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 4, donde la posición que corresponde al 64 de la SEQ ID NO: 1 es una R o K, y donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB inhibe la transducción de señales por la activina, el GDF8 y/o el GDF11 en un ensayo a base de células. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 4 está situada fuera de la cavidad de unión a ligando. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 4 es una alteración conservadora situada dentro de la cavidad de unión a ligando. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 4 es una alteración en una o más posiciones seleccionada del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79.

Se contemplan otros polipéptidos de ActRIIB y polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB, tales como los siguientes. Un polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 4, y donde la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de una secuencia N-X-S/T endógena de ActRIIB y en una posición fuera de la cavidad de unión a ligando. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB comprende una N en la posición que corresponde a la posición 24 de la SEQ ID NO: 1 o 4 y una S o T en la posición que corresponde a la posición 26 de la SEQ ID NO: 1 o 4, y donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB inhibe la transducción de señales por la activina, el GDF8 y/o el GDF11 en un ensayo a base de células. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB comprende una R o K en la posición que corresponde a la posición 64 de la SEQ ID NO: 1 o 4. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB comprende una D o E en la posición que corresponde a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 4, y donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB inhibe la transducción de señales por la activina, el GDF8 y/o el GDF11 en un ensayo a base de células. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 4 es una alteración conservadora situada dentro de la cavidad de unión a ligando. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 4 es una alteración en una o más posiciones seleccionada del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. El polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB anterior, donde el polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB es una proteína de fusión que comprende además una o más porciones heterólogas. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores, o proteínas de fusión de los mismos, se puede producir



como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de ActRIIB o proteínas de fusión de trampa de GDF a base de ActRIIB anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc.

- 5 En ciertos aspectos, un polipéptido de ActRIIB preferido, para uso según los procedimientos descritos en esta solicitud, comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 29, 31 o 49 y polipéptidos que son al menos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores. Un polipéptido de ActRIIB puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 29, 31 o 49 o una secuencia de SEQ ID NO: 2 o 5, que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 carboxiterminales y que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5 en el extremo amínico. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento con respecto a la SEQ ID NO: 2 o 5 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo amínico y de no más de 3 aminoácidos en el extremo carboxílico. Una trampa de GDF preferida para uso según los procedimientos descritos en esta solicitud consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

- Una fórmula general para un polipéptido de ActRIIA activo (p. ej., de unión a ligando) es una que comprende un polipéptido que comienza en el aminoácido 30 y termina en el aminoácido 110 de la SEQ ID NO: 9. Por consiguiente, los polipéptidos de ActRIIA y las trampas de GDF a base de ActRIIA de la presente descripción pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, un polipéptido que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 30-110 de la SEQ ID NO: 9. Opcionalmente, los polipéptidos de ActRIIA y polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA de la presente descripción comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, un polipéptido que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 12-82 de la SEQ ID NO: 9 que comienza opcionalmente en una posición que varía de 1-5 (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5) o 3-5 (p. ej., 3, 4 o 5) y que termina en una posición que varía de 110-116 (p. ej., 110, 111, 112, 113, 114, 115 o 116) o 110-115 (p. ej., 110, 111, 112, 113, 114 o 115) de la SEQ ID NO: 9, respectivamente, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en la cavidad de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 de la cavidad de unión a ligando con respecto a la SEQ ID NO: 9. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIA o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIA o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA anteriores puede comprender además una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIA o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA anteriores, que incluyen homodímeros y/o proteínas de fusión de los mismos, se pueden unir a, y/o inhibir la transducción de señales por, la activina (p. ej., activina A, activina B, activina C o activina AB) en un ensayo a base de células. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIA o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA anteriores, que incluyen homodímeros y/o proteínas de fusión de los mismos, se pueden unir a, y/o inhibir la transducción de señales por, el GDF11 y/o GDF8 en un ensayo a base de células. Opcionalmente, cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB o polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA anteriores, que incluyen homodímeros y/o proteínas de fusión de los mismos, se pueden unir a, y/o inhibir la transducción de señales de, una o más de activina B, activina C, activina E, GDF7 y Nodal en un ensayo a base de células.

- En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRIIA y polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA preferidos, para uso según los procedimientos descritos en esta solicitud, comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 22, 26 o 28 y polipéptidos que son al menos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores. Un polipéptido de ActRIIA o polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIA puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIA natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 22, 26 o 28 o una secuencia de SEQ ID NO: 10, que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 carboxiterminales y que carece de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5 en el extremo amínico. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento con respecto a la SEQ ID NO: 10 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo amínico y de no más de 3 aminoácidos en el extremo carboxílico. Un polipéptido de ActRIIA preferido para uso en los procedimientos descritos en esta solicitud consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o 28.

- 55 Un polipéptido ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRIIA o ActRIIB) o polipéptido de trampa de GDF de la descripción puede incluir una o más alteraciones (p. ej., adiciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ActRII (p. ej., en el dominio de unión a ligando) con respecto a un polipéptido de ActRII de origen natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con respecto al polipéptido de ActRII de origen natural.

- Opcionalmente, los polipéptidos de ActRII (p. ej., polipéptidos de ActRIIA o ActRIIB) y polipéptidos de trampa de GDF de la descripción comprenden uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico.



En algunos aspectos, un polipéptido de ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRIIA o ActRIIB) o polipéptido de trampa de GDF de la descripción puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF (p. ej., un dominio de unión a ligando de un receptor ActRII, opcionalmente con una o más variaciones de secuencia) y uno o más dominios heterólogos adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, direccionamiento a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, absorción/administración, ubicación o distribución tisular, formación de complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Las proteínas de fusión de polipéptidos de ActRII y trampas de GDF pueden incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo natural o mutante) o una albúmina sérica. En ciertos aspectos, una proteína de fusión de polipéptido de ActRII y trampa de GDF comprende un enlazador relativamente desestructurado situado entre el dominio Fc y el dominio de ActRII o trampa de GDF. Este enlazador desestructurado puede corresponder a la región desestructurada de aproximadamente 15 aminoácidos del extremo carboxiterminal del dominio extracelular de ActRII o trampa de GDF (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 5, 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente exentos de estructura secundaria. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede contener, por ejemplo, secuencias de repetición de treonina/serina y glicinas [p. ej., singletes o repeticiones de TG<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 52), TG<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 53) o SG<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 54)] o una serie de tres glicinas. Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como un epítipo de identificación, un epítipo FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. En ciertos aspectos, una proteína de fusión de ActRII o fusión de trampa de GDF comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de ActRII natural (p. ej., una secuencia líder de ActRIIA o ActRIIB natural) o una secuencia líder heteróloga. En ciertos aspectos, la secuencia líder es una secuencia líder de activador del plasminógeno tisular (TPA). En algún aspecto, una proteína de fusión de ActRII o proteína de fusión de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido de ActRII o trampa de GDF truncado en los extremos amino- y carboxiterminal como se describe en esta solicitud. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y las porciones tanto A como C son heterólogas a B. Las porciones A y/o C se pueden fijar a la porción B a través de una secuencia de enlazador.

Opcionalmente, los polipéptidos de ActRII (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB) o polipéptidos de trampa de GDF, que incluyen variantes y proteínas de fusión de los mismos, para ser usados según los procedimientos descritos en esta solicitud se unen a uno o más de ligandos de ActRIIB (p. ej., activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, BMP6, BMP7 y/o Nodal) con una K<sub>d</sub> inferior a 10 micromolar, inferior a 1 micromolar, inferior a 100 nanomolar, inferior a 10 nanomolar o inferior a 1 nanomolar. Opcionalmente, tales polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF inhiben la transducción de señales de ActRII, tal como acontecimientos de transducción de señales intracelulares de ActRIIA y/o ActRIIB desencadenados por un ligando de ActRII (p. ej., la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8).

En ciertos aspectos, la descripción proporciona preparados farmacéuticos que comprenden un antagonista de ActRII de la presente descripción (p. ej., un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, un polipéptido de trampa de GDF) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un preparado farmacéutico también puede incluir uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno o una afección descritos en esta solicitud (p. ej., un compuesto de adición que aumenta los niveles de glóbulos rojos y/o los niveles de hemoglobina en un sujeto que lo necesita, trata o impide la anemia en un sujeto que lo necesita, trata la drepanocitosis es un sujeto que lo necesita, trata o impide una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita). Preferiblemente, un preparado farmacéutico de la descripción está sustancialmente exento de pirógenos. En general, es preferible que un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB o un polipéptido de trampa de GDF se exprese en una estirpe celular de mamífero que media la glucosilación natural del polipéptido adecuadamente para reducir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Las estirpes celulares humanas y CHO se han usado satisfactoriamente y se espera que otros vectores de expresión de mamífero comunes sean útiles. En algunos aspectos, los polipéptidos de ActRIIA, polipéptidos de ActRIIB y polipéptidos de trampa de GDF preferibles están glucosilados y tienen un patrón de glucosilación que es obtenible a partir de una célula de mamífero, preferiblemente una célula CHO. En ciertos aspectos, la descripción proporciona productos farmacéuticos envasados que comprenden un preparado farmacéutico descrito en esta solicitud y etiquetado para uso en uno o más de niveles crecientes de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un mamífero (preferiblemente un ser humano), tratar o impedir la anemia en un mamífero (preferiblemente un ser humano), tratar la drepanocitosis en un mamífero (preferiblemente un ser humano) y/o tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis vasooclusiva, etc.) en un mamífero (preferiblemente un ser humano).

En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRIIA o ActRIIB) o polipéptido de trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF solubles, tal como se describe en esta solicitud. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica un polipéptido de ActRII o una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (p. ej., un dominio de unión a ligando) de un polipéptido de ActRII que tiene una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría todo o parte del dominio transmembranario y/o del dominio citoplásmico de un polipéptido de ActRII, pero para un codón de terminación situado



dentro del dominio transmembranario o el dominio citoplásmico, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembranario o el dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica una trampa de GDF puede comprender una secuencia de polinucleótido de ActRII de longitud completa, tal como la SEQ ID NO: 1, 4 o 9 o que tiene una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido

5 aislado un codón de terminación de la transcripción de al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o situado de otro modo de tal manera que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una porción truncada de un ActRII de longitud completa. Los ácidos nucleicos descritos en esta solicitud se pueden enlazar operativamente a un promotor para la expresión, y la descripción proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero, tal como

10 una célula CHO.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para fabricar un polipéptido de ActRII o una trampa de GDF. Tal procedimiento puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en esta solicitud (p. ej., la SEQ ID NO: 8, 13, 27, 32, 39, 42, 46 o 48) en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino

15 (CHO). Tal procedimiento puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de trampa de GDF, donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de trampa de GDF; y b) recuperar el polipéptido de trampa de GDF así expresado. Los polipéptidos de trampa de GDF se pueden recuperar como fracciones brutas, parcialmente purificadas o muy purificadas usando cualquiera de las técnicas muy conocidas para obtener proteínas a partir de cultivos celulares.

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que antagoniza la actividad de ActRII (p. ej., inhibición de la transducción de señales del ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8). En particular, la descripción proporciona procedimientos para usar un antagonista de ActRII de anticuerpos, o una combinación de antagonistas de ActRII de

20 anticuerpos, para, p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y/o tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o

30 crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea, priapismo) en un sujeto que lo necesita.

En ciertos aspectos, un antagonista de ActRII de anticuerpos preferido de la descripción es un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que se une a, y/o inhibe la actividad de, al menos el GDF11 (p. ej., la activación mediada por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, el anticuerpo, o la combinación de anticuerpos, se une a, y/o inhibe la actividad de, el

40 GDF8 (p. ej., la activación mediada por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o el ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3), particularmente en el caso de un anticuerpo multiespecífico que tiene afinidad de unión tanto por el GDF11 como por el GDF8 o en el contexto de una combinación de uno o más anticuerpos anti-GDF11 y uno o más anticuerpos anti-GDF8. Opcionalmente, un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, de la descripción no se une sustancialmente a, y/o inhibe la actividad de, la activina A (p. ej., la activación mediada

45 por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). En algunos aspectos, un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, de la descripción que se une a, y/o inhibe la actividad de, el GDF11 y/o GDF8 se une además a, y/o inhibe la actividad de, una o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal (p. ej., la activación de la transducción de señales de ActRIIA o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8), particularmente en

50 el aspecto de un anticuerpo multiespecífico que tiene afinidad de unión por múltiples ligandos de ActRII o en el contexto de una combinación de múltiples anticuerpos, que tienen cada uno afinidad de unión por un ligando de ActRII diferente.

En parte, la descripción demuestra que los antagonistas de ActRII se pueden usar en combinación (p. ej., administrados al mismo tiempo o en momentos diferentes, pero generalmente de tal manera que se consigue

55 superponer los efectos farmacológicos) con activadores del receptor de EPO para aumentar los niveles de glóbulos rojos (eritropoyesis) o tratar la anemia en pacientes que lo necesitan. En parte, la descripción demuestra que una trampa de GDF se puede administrar en combinación con un activador del receptor de EPO para aumentar sinérgicamente la formación de glóbulos rojos en un paciente, particularmente en pacientes con drepanocitosis. Por tanto, el efecto de esta politerapia puede ser significativamente superior a la suma de los efectos de los antagonistas

60 de ActRII y el activador del receptor de EPO cuando se administran independientemente en sus dosis correspondientes. En ciertos aspectos, esta sinergia puede ser ventajosa, ya que permite lograr niveles objetivo de glóbulos rojos con dosis inferiores de un activador del receptor de EPO, evitando de ese modo efectos adversos potenciales u otros problemas asociados a niveles superiores de activación del receptor de EPO. Por consiguiente, en ciertos aspectos, los procedimientos de la presente descripción (p. ej., composiciones para uso en el aumento de los

65 niveles de glóbulos rojos y/o la hemoglobina en un sujeto que lo necesita, composiciones para uso en el tratamiento o



la prevención de la anemia en un sujeto que lo necesita , composiciones para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y/o composiciones para uso en el tratamiento o la prevención de una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita) comprenden uno o más antagonistas de ActRII (p. ej., polipéptidos de ActRIIA, polipéptidos de ActRIIB y/o polipéptidos de trampa de GDF). En algunos aspectos, las composiciones para uso de la descripción son para uso en combinación con uno o más activadores del receptor de EPO.

Un activador del receptor de EPO puede estimular la eritropoyesis entrando directamente en contacto y activando el receptor de EPO. En ciertos aspectos, el activador del receptor de EPO es uno de una clase de compuestos basados en la secuencia de 165 aminoácidos de la EPO natural y generalmente conocidos como agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), ejemplos de los cuales son la epoetina alfa, epoetina beta (NeoRecormon™), epoetina delta (Dynepo™) y epoetina omega. En otros aspectos, los ESA incluyen proteínas de EPO sintéticas (SEP) y derivados de la EPO con modificaciones no peptídicas que confieren propiedades farmacocinéticas deseables (semivida circulante prolongada), ejemplos de los cuales son la darbepoetina alfa (Aranesp™) y metoxi-polietilenglicol epoetina beta (Micera™). En ciertos aspectos, un activador del receptor de EPO puede ser un agonista del receptor de EPO que no incorpora la cadena principal del polipéptido de EPO o no se clasifica en general como un ESA. Tales agonistas del receptor de EPO pueden incluir, pero no se limitan a, miméticos peptídicos y no peptídicos de la EPO, anticuerpos agonistas que se dirigen al receptor de EPO, proteínas de fusión que comprenden un dominio mimético de EPO y agonistas limitados del receptor de eritropoyetina de duración prolongada (EREDLA).

En ciertos aspectos, un activador del receptor de EPO puede estimular la eritropoyesis indirectamente, sin entrar en contacto con el propio receptor de EPO, mejorando la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimulantes endógenos de la expresión del gen de la EPO que son inhibidos (desestabilizados) en condiciones normóxicas mediante mecanismos reguladores celulares. En parte, la descripción proporciona eritropoyesis aumentada en un paciente mediante politerapia con una trampa de GDF y un activador indirecto del receptor de EPO con propiedades estabilizantes de HIF, tal como un inhibidor de la prolil hidroxilasa.

Los antagonistas de ActRII, particularmente los polipéptidos de ActRII y polipéptidos de trampa de GDF, también se pueden usar para tratar o impedir otros trastornos y afecciones, tal como para favorecer el crecimiento muscular y/o tratar o impedir un trastorno relacionado con los músculos, favorecer el crecimiento óseo y/o tratar o impedir un trastorno relacionado con los huesos, tratar o impedir el cáncer (particularmente el mieloma múltiple y/o el cáncer de mama) [véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º: 7 612 041; 8 173 601; 7 842 663, así como la solicitud de patente de los EE. UU. con n.º de publicación US 2009/0074768]. En ciertos aspectos, cuando se administra un polipéptido de trampa de GDF para estas otras indicaciones terapéuticas, puede ser deseable supervisar los efectos sobre los glóbulos rojos durante la administración del antagonista de ActRII, o determinar o ajustar la administración del antagonista de ActRII, con el fin de reducir los efectos no deseados sobre los glóbulos rojos. Por ejemplo, los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina o los niveles de hematocrito pueden provocar un aumento en la tensión arterial.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII. En otros aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en la prevención de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a activina (p. ej., activina A y/o activina B). En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF11 y activina (p. ej., activina A y/o activina B). En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de















1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto  
5 que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID  
10 NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido se une a GDF11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la  
15 posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido se une a GDF8. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido  
20 se une a GDF8 y GDF11.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la  
25 SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto  
30 que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID  
35 NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido se une a GDF11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la  
40 posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido se une a GDF8. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido  
45 se une a GDF8 y GDF11.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de analgésicos, crisis de secuestro  
50 esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo) en un sujeto que comprende  
55 un antagonista de ActRII. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación de la drepanocitosis es anemia. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación de la drepanocitosis es crisis de anemia. En algunos aspectos, la descripción proporciona una  
60 composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación de la drepanocitosis es esplenomegalia. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación de la drepanocitosis es crisis de dolor. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la  
65 drepanocitosis en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación de la drepanocitosis es



[illegible]

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en la prevención de una complicación de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de analgésicos, crisis de secuestro



esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo) en un sujeto que comprende un antagonista de ActRII.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos del 80 % (p. ej. al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a activina (p. ej., activina A y/o activina B). En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF11 y activina (p. ej., activina A y/o activina B). En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF8. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF8 y GDF11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, donde el polipéptido se une a GDF8, GDF11 y activina (p. ej., activina A y/o activina B).

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos del 80 % (p. ej. al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, donde el polipéptido se une a activina (p. ej., activina A y/o activina B). En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, donde el polipéptido se une a GDF11 y activina (p. ej., activina A y/o activina B). En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, donde el polipéptido se une a GDF8. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, donde el polipéptido se















tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que

5 consiste en la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el

10 polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido se une a GDF11. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la

15 posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido se une a GDF8.

En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de una complicación de la drepanocitosis en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (p. ej., al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de

20 aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición 79 con respecto a la SEQ ID NO: 1 y donde el polipéptido se une a GDF8 y GDF11.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 muestra un alineamiento de dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 56) y ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) con los residuos que se deducen en esta solicitud, basado en el análisis de material compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA, para entrar directamente en contacto con ligando indicado con recuadros.

La Figura 2 muestra un alineamiento de múltiples secuencias de diversas proteínas de ActRIIB de vertebrados y

30 ActRIIA humano (SEQ ID NO: 57-64).

Las Figuras 3A y 3B muestran la purificación de ActRIIA-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un único pico bien definido, como se visualiza mediante columna de exclusión molecular (3A) y SDS-PAGE con tinción con Coomassie (3B) (carril izquierdo: patrones de peso molecular; carril derecho: ActRIIA-hFc).

Las Figuras 4A y 4B muestran la unión de ActRIIA-hFc a activina y GDF-11, como se mide mediante ensayo Biacore™.

35 Las Figuras 5A y 5B muestran los efectos de ActRIIA-hFc sobre los recuentos de glóbulos rojos en primates no humanos (PNH) hembra. Se trataron macacos cangrejeros hembra (cuatro grupos de cinco macacos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIA-hFc en el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 5A muestra recuentos de glóbulos rojos (RBC). La Figura 5B muestra niveles de hemoglobina. La significación estadística es con respecto al momento inicial para cada grupo de tratamiento. En el día 57, quedaban dos macacos en cada grupo.

40 Las Figuras 6A y 6B muestran los efectos de ActRIIA-hFc sobre los recuentos de glóbulos rojos en primates no humanos (PNH) macho. Se trataron macacos cangrejeros macho (cuatro grupos de cinco macacos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIA-hFc en el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 6A muestra recuentos de glóbulos rojos (RBC). La Figura 6B muestra niveles de hemoglobina. La significación estadística es con respecto al momento inicial para cada grupo de tratamiento. En el día 57, quedaban dos macacos en cada grupo.

45 Las Figuras 7A y 7B muestran los efectos de ActRIIA-hFc sobre los recuentos de reticulocitos en primates no humanos hembra. Se trataron macacos cangrejeros (cuatro grupos de cinco macacos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIA-hFc en el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 7A muestra recuentos absolutos de reticulocitos. La Figura 7B muestra el porcentaje de reticulocitos con respecto a los RBC. La significación estadística es con respecto al momento inicial para cada grupo. En el día 57, quedaban dos macacos en cada grupo.

50 Las Figuras 8A y 8B muestran los efectos de ActRIIA-hFc sobre los recuentos de reticulocitos en primates no humanos macho. Se trataron macacos cangrejeros (cuatro grupos de cinco macacos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIA-hFc en el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 8A muestra recuentos absolutos de reticulocitos. La Figura 8B muestra el porcentaje de reticulocitos con respecto a los RBC. La significación estadística es con respecto al momento inicial para cada grupo. En el día 57, quedaban dos macacos en cada grupo.

55 La Figura 9 muestra los resultados del ensayo clínico en humanos descrito en el Ejemplo 4, donde el área bajo la curva (ABC) y la dosis administrada de ActRIIA-hFc tienen una correlación lineal, independientemente de si ActRIIA-hFc se administró por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea. (s.c.).

La Figura 10 muestra una comparación de los niveles séricos de ActRIIA-hFc en pacientes a los que se les administró por vía i.v. o s.c.

60 La Figura 11 muestra los niveles de fosfatasa alcalina ósea (BAP) en respuesta a diferentes niveles de dosis de ActRIIA-hFc. La BAP es un marcador del crecimiento óseo anabólico.

La Figura 12 representa el cambio en la mediana desde el momento inicial de los niveles de hematocrito del ensayo clínico en humanos descrito en el Ejemplo 4. Se administró ActRIIA-hFc por vía intravenosa (i.v.) a la dosis indicada.

La Figura 13 representa el cambio en la mediana desde el momento inicial de los niveles de hemoglobina del ensayo

65 clínico en humanos descrito en el Ejemplo 4. Se administró ActRIIA-hFc por vía intravenosa (i.v.) a la dosis indicada.



La Figura 14 representa el cambio en la mediana desde el momento inicial del recuento de RBC (glóbulos rojos) del ensayo clínico en humanos descrito en el Ejemplo 4. Se administró ActRIIA-hFc por vía intravenosa (i.v.) a la dosis indicada.

La Figura 15 representa el cambio en la mediana desde el momento inicial del recuento de reticulocitos del ensayo clínico en humanos descrito en el Ejemplo 4. Se administró ActRIIA-hFc por vía intravenosa (i.v.) a la dosis indicada.

La Figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 38), que incluye la secuencia líder de TPA (con subrayado doble), el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 de la SEQ ID NO: 1; subrayados) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 de la secuencia natural tiene subrayado doble y está resaltado, al igual que la glicina que se reveló mediante secuenciación que es el residuo aminoterminal de la proteína de fusión madura.

Las Figuras 17A y 17B muestran una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(L79D 20-134)-hFc. La SEQ ID NO: 39 corresponde a la hebra codificante y la SEQ ID NO: 40 corresponde a la hebra no codificante. La secuencia líder de TPA (nucleótidos 1-66) tiene subrayado doble y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 76-420) está subrayado.

La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 41), que incluye la secuencia líder de TPA (con subrayado doble), el dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1; subrayados) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 de la secuencia natural tiene doble subrayado y está resaltado, al igual que el glutamato que se reveló mediante secuenciación que es el residuo aminoterminal de la proteína de fusión madura.

Las Figuras 19A y 19B muestran una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. La SEQ ID NO: 42 corresponde a la hebra codificante y la SEQ ID NO: 43 corresponde a la hebra no codificante. La secuencia líder de TPA (nucleótidos 1-66) tiene subrayado doble y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1).

La Figura 20 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sin una secuencia líder (SEQ ID NO: 44). El dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 de la secuencia natural tiene doble subrayado y está resaltado, al igual que el glutamato que se reveló mediante secuenciación que es el residuo aminoterminal de la proteína de fusión madura.

La Figura 21 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131) sin la secuencia líder, el dominio hFc y el enlazador (SEQ ID NO: 45). El aspartato sustituido en la posición 79 de la secuencia natural está subrayado y resaltado, al igual que el glutamato que se reveló mediante secuenciación que es el residuo aminoterminal en la proteína de fusión madura.

Las Figuras 22A y 22B muestran una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. La SEQ ID NO: 46 corresponde a la hebra codificante y la SEQ ID NO: 47 corresponde a la hebra no codificante. La secuencia líder de TPA (nucleótidos 1-66) tiene subrayado doble, el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo natural del dominio extracelular tienen subrayado doble y están resaltadas (comparar con la SEQ ID NO: 42, Figura 19). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1).

La Figura 23 muestra los nucleótidos 76-396 (SEQ ID NO: 48) de la secuencia de nucleótidos alternativa mostrada en la Figura 22 (SEQ ID NO: 46). Las mismas sustituciones de nucleótidos indicadas en la Figura 22 también están subrayadas y resaltadas aquí. La SEQ ID NO: 48 codifica solo el dominio extracelular de ActRIIB truncado (que corresponde a los residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1) con una sustitución L79D, p. ej., ActRIIB(L79D 25-131).

La Figura 24 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de glóbulos rojos desde el momento inicial en el macaco cangrejero. VEh = vehículo. Los datos son medias  $\pm$  EEM. n = 4-8 por grupo.

La Figura 25 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en el hematocrito desde el momento inicial en el macaco cangrejero. VEh = vehículo. Los datos son medias  $\pm$  EEM. n = 4-8 por grupo.

La Figura 26 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de hemoglobina desde el momento inicial en el macaco cangrejero. VEh = vehículo. Los datos son medias  $\pm$  EEM. n = 4-8 por grupo.

La Figura 27 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de reticulocitos circulantes desde el momento inicial en el macaco cangrejero. VEh = vehículo. Los datos son medias  $\pm$  EEM. n = 4-8 por grupo.

La Figura 28 muestra el efecto de la politerapia con eritropoyetina (EPO) y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre el hematocrito en ratones. Los datos son medias  $\pm$  EEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05, prueba t para datos no relacionados) se designan mediante letras diferentes. La politerapia aumentó el hematocrito en 23 % en comparación con el vehículo, un aumento sinérgico superior a la suma de los efectos individuales de la EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc.

La Figura 29 muestra el efecto de la politerapia con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre las concentraciones de hemoglobina en ratones. Los datos son medias  $\pm$  EEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05) se designan mediante letras diferentes. La politerapia aumentó las concentraciones de hemoglobina en 23 % en comparación con el vehículo, lo que también fue un efecto sinérgico.

La Figura 30 muestra el efecto de la politerapia con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre las



concentraciones de glóbulos rojos (RBC) en ratones. Los datos son medias  $\pm$  EEM ( $n = 4$  por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ) se designan mediante letras diferentes. La politerapia aumentó las concentraciones de glóbulos rojos en 20 % en comparación con el vehículo, lo que también fue un efecto sinérgico.

La Figura 31 muestra el efecto de la politerapia con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre los números de células precursoras eritropoyéticas en bazo de ratón. Los datos son medias  $\pm$  EEM ( $n = 4$  por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,01$ ) se designan mediante letras diferentes. Mientras que la EPO sola aumentó el número de eritroblastos basófilos (BasoE) drásticamente a expensas de la maduración de precursores de la etapa tardía, la politerapia aumentó los números de BasoE en menor medida, pero aún de manera significativa, a la vez que mantuvo la maduración de precursores de la etapa tardía invariable.

La Figura 32 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre el cambio absoluto en la concentración de glóbulos rojos (RBC) en ratones con drepanocitosis (SCD). Los datos son medias  $\pm$  EEM. ( $n = 5$  por grupo). Wt = ratones de tipo natural, que eran ratones ( $\beta/\beta^S$ ) heterocigotos compuestos no sintomáticos. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc dio como resultado un aumento significativo de los niveles de glóbulos rojos en los ratones con drepanocitosis ( $p \leq 0,001$ ) en comparación con los ratones de control (ratones con drepanocitosis a los que se administró solo vehículo)

La Figura 33 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hematocrito y los niveles de hemoglobina en ratones con drepanocitosis. Los datos son cambios en la media desde el momento inicial a lo largo de 4 semanas ( $\pm$  EEM) frente a los ratones de control con drepanocitosis tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc dio como resultado un aumento significativo en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hematocrito y los niveles de hemoglobina en los ratones con drepanocitosis en comparación con los ratones con drepanocitosis tratados con vehículo (control).

La Figura 34 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre diversos parámetros sanguíneos (es decir, volumen corpuscular medio, ancho de la distribución de glóbulos rojos (RBC), reticulocitos y especies reactivas del oxígeno) en ratones con drepanocitosis. Los datos son cambios en la media desde el momento inicial a lo largo de 4 semanas ( $\pm$  EEM) frente a los ratones con drepanocitosis tratados con vehículo (control). El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc dio como resultado un aumento significativo en el volumen corpuscular medio, el ancho de la distribución de glóbulos rojos (RBC), los reticulocitos y las especies reactivas del oxígeno en los ratones con drepanocitosis en comparación con los ratones de control.

La Figura 35 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre la lesión de órganos afectados en ratones con SCD. Se representan muestras histológicas (bazo, pulmón y riñón) de ratones  $\beta/\beta^S$ , ratones con SCD tratados con vehículo (TBS) solo (s.c., dos veces a la semana durante seis semanas) y ratones con SCD tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (s.c., dos veces a la semana a 10 mg/kg durante seis semanas). El análisis histológico de los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc muestra una reducción sustancial de la congestión vascular y la lesión en el bazo y los riñones (se muestra la unión corticomedular) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Además, la terapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo el engrosamiento de la pared alveolar en los pulmones (véanse las flechas negras) en mayor medida que el tratamiento con vehículo. Aumento del objetivo - 20X; inserciones - 100X.

La Figura 36 muestra el efecto de la politerapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc e hidroxiurea (HU) sobre la lesión de órganos afectados en ratones con SCD. Se representan muestras histológicas (bazo, pulmón y riñón) de ratones con SCD tratados con vehículo (TBS) solo (s.c., dos veces a la semana), ratones con SCD tratados con HU sola (i.p., dos veces a la semana a 100 mg/kg) y ratones con SCD tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (inyección s.c., dos veces a la semana a 10 mg/kg) y HU (i.p., dos veces a la semana a 100 mg/kg). El análisis histológico de los ratones con SCD tratados con politerapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y HU muestra una reducción superior de la congestión vascular y la lesión en el bazo y los riñones en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo o monoterapia de HU. Además, la politerapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y HU redujo el engrosamiento de la pared alveolar en los pulmones (véanse las flechas negras) en mayor medida que el tratamiento con monoterapia de HU. Aumento del objetivo - 20X; inserciones - 100X.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DESCRIPCIÓN

### 1. Análisis general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene un abanico de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre un gran abanico de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación tisular y pueden influir en un abanico de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de las células epiteliales. Manipulando la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, a menudo es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado vacuno piamontesa y azul belga llevan una mutación de pérdida de función en el gen del GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un aumento notable en la masa muscular [véase, p. ej., Grobet y col. (1997) Nat Genet. 17(1):71-4]. Asimismo, en los seres humanos, los alelos inactivos del GDF8 están asociados a una masa muscular aumentada y, aparentemente, a una fuerza excepcional [véase, p. ej., Schuelke y col. (2004) N Engl J Med, 350:2682-8].



Las señales de la superfamilia TGF- $\beta$  están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de la serina/treonina cinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan aguas abajo las proteínas SMAD (p. ej., las proteínas SMAD 1, 2, 3, 5 y 8) tras la estimulación del ligando [véase, p. ej., Massagué (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178]. Estos receptores de tipo I y tipo II son proteínas transmembranarias, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembranario y un dominio citoplásmico con especificidad por la serina/treonina prevista. Los receptores de tipo I son esenciales para la transducción de señales. Los receptores de tipo II son necesarios para unir ligandos y para la activación de los receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión a ligando, lo que da como resultado la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

Dos receptores de tipo II (ActRII) relacionados, ActRIIA y ActRIIB, se han identificado como los receptores de tipo II para las activinas [véase, p. ej., Mathews y Vale (1991) Cell 65:973-982 y Attisano y col. (1992) Cell 68: 97-108]. Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF- $\beta$  que incluyen, por ejemplo, BMP6, BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 [véase, p. ej., Yamashita y col. (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 y col. (2002) Genes Dev. 16:2749-54]. ALK4 es el receptor de tipo I principal para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede actuar como receptor para otras activinas, particularmente para la activina B. En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a antagonizar un ligando de un receptor ActRII (también denominado un ligando de ActRII) con uno o más agentes inhibidores descritos en esta solicitud, particularmente agentes inhibidores que pueden antagonizar uno o más de activina A, activina B, activina C, activina E, GDF11 y/o GDF8.

La activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades  $\beta$  relacionadas estrechamente ( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$  y  $\beta_A\beta_B$ , respectivamente). El genoma humano codifica también una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y también se conocen formas heterodiméricas que contienen  $\beta_C$  o  $\beta_E$ .

En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores exclusivos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, mantener la supervivencia de las células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular positiva o negativamente en función del tipo celular e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios [DePaolo y col. (1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson y col. (1997) Curr Biol. 7:81-84 y Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]. Asimismo, se ha encontrado que el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas es idéntico a la activina A [Murata y col. (1988) PNAS, 85:2434]. Se ha sugerido que la activina A favorece 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 hormona foliculoestimulante (FSH) desde la pituitaria, la activina favorece la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada con la folistatina (FSRP, también conocida como FLRG o FSTL3) y la  $\alpha_2$ -macroglobulina.

Como se describe en esta solicitud, los agentes que se unen a "activina A" son agentes que se unen específicamente a la subunidad  $\beta_A$ , ya sea en el contexto de una subunidad  $\beta_A$  aislada o como un complejo dimérico (p. ej., un homodímero  $\beta_A\beta_A$  o un heterodímero  $\beta_A\beta_B$ ). En el caso de un complejo de heterodímero (p. ej., un heterodímero  $\beta_A\beta_B$ ), los agentes que se unen a "activina A" son específicos para epítopos presentes dentro de la subunidad  $\beta_A$ , pero no se unen a epítopos presentes dentro de la subunidad que no es  $\beta_A$  del complejo (p. ej., la subunidad  $\beta_B$  del complejo). Similarmente, los agentes descritos en esta solicitud que antagonizan (inhiben) la "activina A" son agentes que inhiben una o más actividades mediadas por una subunidad  $\beta_A$ , ya sea en el contexto de una subunidad  $\beta_A$  aislada o como un complejo dimérico (p. ej., 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  $\beta_A$ , pero no inhiben la actividad de la subunidad que no es  $\beta_A$  del complejo (p. ej., la subunidad  $\beta_B$  del complejo). Este principio se aplica también a los agentes que se unen a, y/o inhiben, la "activina B", "activina C" y "activina E". Los agentes descritos en esta solicitud que antagonizan la "activina AB" son agentes que inhiben una o más actividades mediadas por la subunidad  $\beta_A$  y una o más actividades mediadas por la subunidad  $\beta_B$ .

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y endodermo, así como en la organización posterior de estructuras axiales tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal de un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la placa notocordal y precordal, a la vez que recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalizar tanto a través de los receptores de tipo I y tipo II como de efectores intracelulares conocidos como proteínas SMAD. Los estudios respaldan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal [véase, p. ej., Sakuma y col. (2002) Genes Cells. 2002, 7:401-12]. Se sugiere a que los ligandos de Nodal interactúan con sus cofactores (p. ej., cripto) para activar los receptores de activina de tipo I y tipo II, que fosforilan la SMAD2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos acontecimientos cruciales para el embrión de vertebrado incipiente, que incluyen la formación del mesodermo, la formación del patrón anterior y la especificación del eje izquierda-derecha. Los datos experimentales han demostrado que la transducción de señales



de Nodal activa pAR3-Lux, un indicador de luciferasa que se demostró anteriormente que responde específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir pTlx2-Lux, un indicador sensible específicamente a las proteínas morfogenéticas óseas. Los resultados recientes proporcionan pruebas bioquímicas directas de que la transducción de señales de Nodal está mediada por ambas SMAD de la vía de activina-TGF-beta, la SMAD2 y SMAD3.

- 5 Las pruebas adicionales han demostrado que la proteína cripto extracelular es necesaria para la transducción de señales de Nodal, lo que la diferencia de la transducción de señales por activina o TGF-beta.

El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8) también se conoce como miostatina. El GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. El GDF8 está muy expresado en el músculo esquelético en desarrollo y  
10 adulto. La mutación anuladora del GDF8 en ratones transgénicos está caracterizada por una hipertrofia e hiperplasia notables del músculo esquelético [McPherron y col., *Nature*, 1997, 387:83-90]. Aumentos similares en la masa muscular esquelética son evidentes en mutaciones de origen natural del GDF8 en ganado bovino [véase, p. ej., Ashmore y col. (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 y col. (1997) *Genome Res.* 7:910-915] y,  
15 sorprendentemente, en seres humanos [véase, p. ej., Schuelke y coll. (2004) *N Engl J Med* 350:2682-8]. Los estudios también han demostrado que la atrofia muscular asociada a la infección por VIH en seres humanos va acompañada de aumentos en la expresión de proteína GDF8 [véase, p. ej., González-Cadauid y col. (1998) *PNAS* 95:14938-43]. Además, el GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (p. ej., creatina cinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos [véase, p. ej., la solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO  
20 00/43781]. El propéptido de GDF8 se puede unir de forma no covalente al dímero del dominio de GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica [véase, p. ej., Miyazono y col. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield y col. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654 y Brown y col. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43]. Otras proteínas que se unen al GDF8 o proteínas relacionadas estructuralmente e inhiben su actividad biológica incluyen la follistatina y, potencialmente, proteínas relacionadas con la follistatina [véase, p. ej., Gamer y col. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232].

25 El factor 11 de crecimiento y diferenciación (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada [McPherron y col., 1999, *Nat. Genet.* 22: 260-264]. El GDF11 se expresa en el brote caudal, el brote de las extremidades, los arcos maxilar y mandibular y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón [véase, p. ej., Nakashima y col. (1999) *Mech. Dev.* 80: 185-189]. El GDF11 desempeña un papel exclusivo en la formación del  
30 patrón de los tejidos tanto mesodérmico como neural [véase, p. ej., Gamer y col. (1999) *Dev Biol.*, 208:222-32]. Se demostró que el GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y miogénesis en las extremidades de los polluelos en desarrollo [véase, p. ej., Gamer y col. (2001) *Dev Biol.* 229:407-20]. La expresión de GDF11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de una manera similar al GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que el GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la  
35 función del sistema nervioso. Interesantemente, se encontró que el GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo [véase, p. ej., Wu y col. (2003) *Neuron*. 37:197-207].

La proteína morfogenética ósea (BMP7), también denominada proteína osteogénica 1 (OP-1), se sabe que induce la formación de cartílagos y huesos. Además, la BMP7 regula un amplio abanico de procesos fisiológicos. Por ejemplo,  
40 la BMP-7 puede ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se encontró que la BMP7 desempeña una función en la regulación del calcio y la homeostasis ósea. Al igual que la activina, la BMP7 se une a receptores de tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, la BMP7 y la activina reclutan distintos receptores de tipo I en los complejos de receptores heteroméricos. El receptor de tipo I principal de la BMP7 observado fue ALK2, mientras que la activina se unía exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). La BMP7 y la activina provocaron  
45 respuestas biológicas distintas y activaron vías de las SMAD diferentes [véase, p. ej., Macias-Silva y col. (1998) *J Biol Chem.* 273:25628-36].

Como se demuestra en esta solicitud, los polipéptidos de ActRII (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB) se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*. En ciertos ejemplos, se muestra que un polipéptido de trampa  
50 de GDF (específicamente una variante de polipéptido de ActRIIB) está caracterizado por propiedades biológicas exclusivas en comparación con una muestra correspondiente de un polipéptido de ActRII de tipo natural (no modificado). Esta trampa de GDF está caracterizada, en parte, por una pérdida sustancial de la afinidad de unión por activina A y, por lo tanto, una capacidad significativamente reducida para antagonizar la actividad de la activina A, pero conserva niveles de unión e inhibición del GDF11 prácticamente de tipo natural. La trampa de GDF es más efectiva  
55 para aumentar los niveles de glóbulos rojos en comparación con el polipéptido de ActRII de tipo natural y tiene efectos beneficiosos en un abanico de modelos de anemia y drepanocitosis. En particular, se demuestra que un polipéptido de trampa de GDF se puede usar para mejorar la morfología de los glóbulos rojos, aumentar los niveles de glóbulos rojos, aumentar la capacidad de transportar oxígeno de la hemoglobina e impedir la lesión tisular debida a la congestión vascular y la hipoxia en pacientes con drepanocitosis, lo que indica un uso mucho más amplio de los antagonistas de  
60 ActRII en el tratamiento de la drepanocitosis además de la mitigación de la anemia. Cabe señalar que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por un abanico de factores, que incluye la homeostasis de la eritropoyetina, el G-CSF y la homeostasis del hierro. Los términos "aumentar los niveles de glóbulos rojos" y "favorecer la formación de glóbulos rojos" se refieren a métricas observables clínicamente, tales como hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y mediciones de hemoglobina, y están destinados a ser neutros en cuanto al mecanismo por el que se producen tales  
65 cambios.



Los datos de la presente descripción indican, por lo tanto, que la actividad biológica observada de un polipéptido de ActRII, con respecto a los niveles de glóbulos rojos, no es dependiente de la inhibición de la activina A. Sin embargo, cabe señalar que el polipéptido de ActRIIB no modificado, que conserva la unión a activina A, sigue presentando la capacidad para aumentar los glóbulos rojos *in vivo*. Asimismo, un polipéptido de ActRIIB o ActRIIA que conserva la inhibición de la activina A puede ser más deseable en algunas aplicaciones, en comparación con una trampa de GDF que tiene afinidad de unión reducida por la activina A, en las que son deseables ganancias más modestas en los niveles de glóbulos rojos y/o en las que un cierto nivel de actividad inespecífica es aceptable (o incluso deseable).

- 10 Por consiguiente, los procedimientos de la presente descripción, en general, están orientados al uso de uno o más agentes antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud, opcionalmente en combinación con uno o más tratamientos complementarios, para aumentar la formación de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, para tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y para tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosas, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea, priapismo).

En algunos aspectos, los agentes antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud se pueden usar en combinación con un activador del receptor de EPO o en pacientes en los que ha fracasado el tratamiento con un activador del receptor de EPO.

La EPO es una hormona glucoproteica implicada en el crecimiento y la maduración de células progenitoras eritroides en eritrocitos. La EPO es producida por el hígado durante la vida del feto y por el riñón en adultos. Una producción reducida de EPO, que habitualmente se produce en adultos como consecuencia de la insuficiencia renal, conduce a anemia. La EPO se ha producido mediante técnicas de ingeniería genética basadas en la expresión y secreción de la proteína a partir de una célula hospedadora transfectada con el gen de la EPO. La administración de tal EPO recombinante ha sido efectiva en el tratamiento de la anemia. Por ejemplo, Eschbach y col. (1987, N Engl J Med 316:73) describen el uso de EPO para corregir la anemia provocada por insuficiencia renal crónica.

Los efectos de la EPO están mediados por su unión a, y activación de, un receptor de la superficie celular que pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas y designado el receptor de EPO. Los receptores de EPO humanos y murinos han sido clonados y expresados [véase, p. ej., D'Andrea y col. (1989) Cell 57:277; Jones y col. (1990) Blood 76:31; Winkelman y col. (1990) Blood 76:24 y la patente de los EE. UU. n.º 5 278 065]. El gen del receptor de EPO humano codifica una proteína transmembranaria de 483 aminoácidos que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 224 aminoácidos y presenta aproximadamente 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el receptor de EPO murino (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6 319 499). El receptor de EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamífero (66-72 kDa) une la EPO con una afinidad ( $K_D = 100\text{-}300\text{ nM}$ ) similar a la del receptor natural de las células progenitoras eritroides. Por tanto, se cree que esta forma contiene el determinante de unión a EPO principal y se denomina el receptor de EPO. Por analogía con otros receptores de citocinas estrechamente relacionados, se cree que el receptor de EPO dimeriza tras la unión a agonista. No obstante, la estructura detallada del receptor de EPO, que puede ser un complejo multimérico, y su mecanismo de activación específico no se entienden completamente (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6 319 499).

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

Los activadores del receptor de EPO incluyen agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) de molécula pequeña, así como compuestos a base de EPO. Un ejemplo de lo anterior es un agonista a base de péptidos diméricos enlazado covalentemente a polietilenglicol (denominaciones comerciales Hematide™ y Omontys®), que ha presentado propiedades estimulantes de la eritropoyesis en voluntarios sanos y en pacientes tanto con nefropatía crónica como con anticuerpos anti-EPO endógenos [véase, p. ej., Stead y col. (2006) Blood 108:1830-1834 y Macdougall y col.



(2009) N Engl J Med 361:1848-1855]. Otros ejemplos incluyen ESA no basados en péptidos [véase, p. ej., Qureshi y col. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161].

Los activadores del receptor de EPO también incluyen compuestos que estimulan la eritropoyesis indirectamente, sin entrar en contacto con el propio receptor de EPO, mejorando la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimulantes endógenos de la expresión del gen de la EPO que son inhibidos (desestabilizados) en condiciones normóxicas mediante mecanismos reguladores celulares. Por lo tanto, se están investigando inhibidores de enzimas proil hidroxilasa de HIF para determinar la actividad inductora de EPO *in vivo*. Otros activadores indirectos del receptor de EPO incluyen inhibidores del factor de transcripción GATA-2 [véase, p. ej., Nakano y col. (2004) Blood 104:4300-4307], que inhibe tónicamente la expresión del gen de la EPO, e inhibidores de la fosfatasa de células hematopoyéticas (HCP o SHP-1), que actúan como un regulador negativo de la transducción de señales del receptor de EPO [véase, p. ej., Klingmuller y col. (1995) Cell 80:729-738].

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta descripción y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se describen a continuación o en otra parte de la memoria descriptiva para proporcionar una orientación adicional al facultativo a la hora de describir las composiciones y los procedimientos de la descripción y cómo prepararlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se usa.

“Homóloga”, en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un “origen evolutivo común”, lo que incluye proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Tales 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.

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

Sin embargo, en el uso habitual y en la presente solicitud, el término “homóloga”, cuando está modificado con un adverbio tal como “muy”, se puede referir a similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia” con respecto a una secuencia de polipéptido (o nucleótidos) de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido (o ácidos nucleicos) de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido (o ácidos nucleicos) de la secuencia de polipéptido (o nucleótidos) de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas maneras que se encuentran dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, lo que incluye cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, a efectos de esta solicitud, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos (ácidos nucleicos) se generan usando 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 se ha depositado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los EE. UU., Washington D.C., 20559, en la que está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de los EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente en Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para uso en un sistema operativo UNIX, lo que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Como se emplea en esta solicitud, la expresión “no se une sustancialmente a X” está destinada a significar que un agente tiene una  $K_D$  que es superior a aproximadamente  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  o superior (p. ej., ausencia de unión detectable mediante el ensayo usado para determinar la  $K_D$ ) para “X”.

## 2. Antagonistas de ActRII

Los datos presentados en esta solicitud demuestran que los antagonistas (inhibidores) de ActRII (p. ej., antagonista de la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8 de ActRIIA y/o ActRIIB) se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo* y proporcionar otros beneficios a sujetos (pacientes) que los necesitan. En particular, en esta solicitud se demuestra que tales antagonistas de ActRII son efectivos en el tratamiento de diversas anemias, así como de diversas complicaciones (por ejemplo, trastornos/afecciones) de la drepanocitosis. Por



conseguida, la presente descripción proporciona, en parte, diversos agentes antagonistas de ActRII que se pueden, usar solos o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios [p. ej., tratamiento con hidroxurea, transfusión de sangre, terapia de quelación de hierro y/o tratamiento del dolor (p. ej., tratamiento con uno o más de agentes analgésicos opioides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y/o corticosteroides)], para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y/o tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo) en un sujeto que lo necesita.

En ciertos aspectos, los antagonistas de ActRII preferidos para ser usados según los procedimientos descritos en esta solicitud son antagonistas de GDF-ActRII (p. ej., antagonistas de la transducción de señales mediada por GDF de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como transducción de señales a través de SMAD 2/3), particularmente la transducción de señales de ActRII mediada por GDF11 y/o GDF8. En algunos aspectos, los antagonistas de ActRII preferidos de la presente descripción son polipéptidos de ActRII solubles (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB solubles) y polipéptidos de trampa de GDF, tales como proteínas de fusión ActRIIA-Fc, proteínas de fusión ActRIIB-Fc y proteínas de fusión de trampa de GDF-Fc.

Aunque los polipéptidos de ActRII solubles y polipéptidos de trampa de GDF de la descripción pueden influir en los niveles de glóbulos rojos y/o en diversas complicaciones de la drepanocitosis mediante un mecanismo distinto del antagonismo de GDF (p. ej., GDF11 y/o GDF8) [p. ej., la inhibición del GDF11 y/o GDF8 puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de agentes adicionales, que incluyen, quizás, otros miembros de la superfamilia TGF-beta (p. ej., activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal), y tal inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado sobre, p. ej., la hematopoyesis], se espera que sean útiles otros tipos de antagonistas de GDF-ActRII que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-GDF11; anticuerpos anti-GDF8; anticuerpos anti-activina A, B, C y/o E, anticuerpos anti-ActRIIA; anticuerpos anti-ActRIIB; anticuerpos anti-ActRIIA/IIB, ácidos nucleicos no codificantes, de ARNi o ribozimas que inhiben la producción de uno o más de GDF11, GDF8, ActRIIA y/o ActRIIB; y otros inhibidores (p. ej., inhibidores de molécula pequeña) de uno o más de GDF11, GDF8, ActRIIA y/o ActRIIB, particularmente agentes que alteran la unión de GDF11- y/o GDF8-ActRIIA y/o GDF11- y/o GDF8-ActRIIB, así como agentes que inhiben la expresión de uno o más de GDF11, GDF8, ActRIIA y/o ActRIIB. Opcionalmente, los antagonistas de GDF-ActRII de la presente descripción se pueden unir a, y/o inhibir la actividad (o expresión) de, otros ligandos de ActRII que incluyen, por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal. Opcionalmente, un antagonista de GDF-ActRII de la presente descripción se puede usar en combinación con al menos un agente antagonista de ActRII adicional que se une a, y/o inhibe la actividad (o expresión) de, uno o más ligandos de ActRII adicionales que incluyen, por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal. En algunos aspectos, los antagonistas de ActRII que se van a usar según los procedimientos descritos en esta solicitud no se unen sustancialmente a, y/o inhiben, la activina A (p. ej., la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3).

#### **A. Polipéptidos de ActRII y trampas de GDF**

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a polipéptidos de ActRII. En particular, la descripción proporciona procedimientos para usar uno o más polipéptidos de ActRII, solos o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios (p. ej., transfusión de glóbulos rojos o sangre entera, terapia de quelación de hierro, tratamiento con hidroxurea, etc.), para, por ejemplo, aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo) y/o reducir la carga de transfusión de sangre en un sujeto que lo necesita. Como se emplea en esta solicitud, el término "ActRII" se refiere a la familia de receptores de activina de tipo II. Esta familia incluye tanto el receptor de activina de tipo IIA como el receptor de activina de tipo IIB.

Como se emplea en esta solicitud, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas de receptor de activina de



tipo IIB (ActRIIB) de cualquier especie y a variantes derivadas de tales proteínas ActRIIB mediante mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIB en esta solicitud se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIB generalmente son proteínas transmembranarias, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando que comprende una región rica en cisteína, un dominio transmembranario y un dominio citoplásmico con actividad serina/treonina cinasa prevista.

El término "polipéptido de ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas), que conserva una actividad útil. Los ejemplos de tales variantes de polipéptidos de ActRIIB se proporcionan a lo largo de la presente descripción, así como en la solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO 2006/012627. Opcionalmente, los polipéptidos de ActRIIB de la presente descripción se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. La numeración de los aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en esta solicitud se basa en la numeración de la secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano proporcionada más adelante (SEQ ID NO:1), a menos que se designe específicamente de otro modo.

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

```

1MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLERCE
51GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKG CWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLLEIKARGR
201FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG
401KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDWHLKHPGL
451AQLCVTIEEC WDHD AEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO:1)

```

El péptido señal está indicado con subrayado único; el dominio extracelular está indicado en **negrita** y los puntos de N-glucosilación endógenos potenciales están indicados con subrayado doble.

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

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APT (SEQ ID NO:2).

```

En algunos aspectos, la proteína se puede producir con una secuencia "SGR..." en el extremo amínico. La "cola" del extremo carboxiterminal del dominio extracelular está indicada mediante subrayado único. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:3).

```

También se describe en la bibliografía una forma de ActRIIB con una alanina en la posición 64 de la SEQ ID NO: 1 (A64) [véase, p. ej., Hilden y col. (1994) Blood, 83 (8): 2163-2170]. Los solicitantes han determinado que una proteína de fusión 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 ActRIIB-Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad para la activina y el GDF11 en el intervalo de nanomolar bajo a picomolar alto. Por lo tanto, las secuencias con una R64 se usan como la secuencia de referencia de "tipo natural" para ActRIIB humano en esta descripción.

5

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

```

1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
    51GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKG CWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
    101FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
    151LIVLLAFWY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
    201FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
    251EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY
    301LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
    351PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQ RDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
    401KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHGGL
    451AQLCVTIEEC WDHD AEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
    501TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO:4).
```

10

El péptido señal está indicado mediante subrayado único y el dominio extracelular está indicado en **negrita**.

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

15

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APT (SEQ ID NO:5).
```

En algunos aspectos, la proteína se puede producir con una secuencia "SGR..." en el extremo amínico. La "cola" del extremo carboxiterminal del dominio extracelular está indicada mediante subrayado único. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia  $\Delta 15$ ) es la siguiente:

20

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:6).
```

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIB humano se muestra a continuación (SEQ ID NO: 7), que consta de los nucleótidos 25-1560 de la secuencia de referencia de Genbank NM\_001106.3, que codifica los aminoácidos 1-513 del precursor de ActRIIB. La secuencia mostrada proporciona una arginina en la posición 64 y se puede modificar para proporcionar una alanina en su lugar. La secuencia señal está subrayada.

25

```

1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
    51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
    101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
```



```

151GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
201TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
251GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
301TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
351AGAGGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCGG ACAGCCCCCA
401CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC
451CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCCTA
501CGGTTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
551TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
601TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
651GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
701TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
751GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
801CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
851GGAACGAAC GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTACGAGG CCTCTCATAC
901CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
951TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
1001CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTGA GCCAGGGAAA
1051CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
1101TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
1151TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
1201AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
1251GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
1301AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG
1351GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
1401TCGCTTGTCG GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
1451CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
1501ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC

```

(SEQ ID NO: 7).

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de ActRIIB humano (extracelular) soluble procesado es la siguiente (SEQ ID NO: 8). La secuencia mostrada proporciona una arginina en la posición 64 y se puede modificar 5 para proporcionar una alanina en su lugar.

```

1GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACCTG

```



51GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC  
 101AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC  
 151ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA  
 201TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT  
 251GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTG GCCAGAGGCT  
 301GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC

(SEQ ID NO:8).

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a polipéptidos de ActRIIA. Como se emplea en esta solicitud, el término "ActRIIA" se refiere a una familia de proteínas de receptores de activina de tipo IIA (ActRIIA) de cualquier especie y a variantes derivadas de tales proteínas ActRIIA mediante mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIA, en esta solicitud, se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIA generalmente son proteínas transmembranarias, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando que comprende una región rica en cisteína, un dominio transmembranario y un dominio citoplásmico con actividad de serina/treonina cinasa prevista.

El término "polipéptido de ActRIIA" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIA, así como cualquier variante de los mismos (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conserva una actividad útil. Los ejemplos de tales variantes de polipéptidos de ActRIIA se proporcionan a lo largo de la presente descripción, así como en la solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO 2006/012627. Opcionalmente, los polipéptidos de ActRIIA de la presente descripción se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. La numeración de los aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIA descritos en esta solicitud se basa en la numeración de la secuencia de proteína precursora de ActRIIA humano proporcionada a continuación (SEQ ID NO:9), a menos que se designe específicamente de otro modo.

La secuencia de proteína precursora de ActRIIA humano es la siguiente:

1MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LEFNANWEKD RTNQTGVEPC  
 51YGD~~DKRR~~HCFATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV  
 101YFCCCEGNMC NEKFSYFP~~EM~~ EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSVLPLMLI  
 151AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEV~~KAR~~  
 201GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI  
 251GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVS~~WNE~~LC HIAETMARGL  
 301AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG  
 351KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR  
 401CTAADGPVDE YMLPFE~~EE~~IG QHPSLED~~MQE~~ VVVHKKKRPV LR~~DY~~WQKHAG  
 451MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM  
 501VTNVDFPPKE SSL

(SEQ ID NO:9)

El péptido señal está indicado mediante subrayado único; el dominio extracelular está indicado en **negrita** y los puntos de N-glucosilación endógenos potenciales están indicados mediante subrayado doble.

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

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~DKRR~~HCFATWKNISGSIEIVKQG**  
**CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP~~EM~~EVTQPTSNPVTPK**  
**PP** (SEQ ID NO:10)

La "cola" del extremo carboxiterminal del dominio extracelular está indicada mediante subrayado único. La secuencia



con la "cola" eliminada (una secuencia  $\Delta 15$ ) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG  
CWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO:11)

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIA humano se muestra a continuación (SEQ ID NO: 12), como sigue a los nucleótidos 159-1700 de la secuencia de referencia de Genbank NM\_001616.4. La secuencia señal está subrayada.

1atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc  
51ttcagggtgct atacttggtgta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta  
101atgctaattg ggaaaaagac agaaccaatc aaactgggtgt tgaaccgtgt  
151tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt tttgctacct ggaagaatat  
201ttctggttcc attgaaatag tgaaacaagg ttgttggtgt gatgatatca  
251actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta  
301tatTTTTTgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt  
351tccggagatg gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc  
401caccctatta caacatcctg ctctattcct tgggtgccact tatgttaatt  
451gcgggggattg tcatttgtgc attttgggtg tacaggcatc acaagatggc  
501ctaccctcct gtacttggtc caactcaaga cccaggacca ccccccactt  
551ctccattact aggtttgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg  
601ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc  
651tgtcaaaaata tttccaatac aggacaaaca gtcattggcaa aatgaatacg  
701aagtctacag tttgcctgga atgaagcatg agaacatatt acagttcatt  
751ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat gtggatcttt ggctgatcac  
801agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag gctaattgtg  
851tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg  
901gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc  
951catatctcac agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc  
1001tgacagcttg cattgctgac tttgggttg ccttaaaatt tgaggctggc  
1051aagtctgcag gcgataccca tggacagggtt ggtacccgga ggtacatggc  
1101tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat gcatttttga  
1151ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc  
1201tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga  
1251ggaaattggc cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc  
1301ataaaaaaaaa gaggcctgtt ttaagagatt attggcagaa acatgctgga  
1351atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa tggtgggatc acgacgcaga  
1401agccagggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc cagatgcaga  
1451gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg  
1501gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtcta

(SEQ ID NO:12)



La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de ActRIIA humano (extracelular) soluble procesado es la siguiente:

```

1ataacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg
51ggaaaaagac agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca
101aagataaacg gcggcattgt tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc
151attgaaatag tgaaacaagg ttgttggtgt gatgatatca actgctatga
201caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta tatttttgtt
251gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccggagatg
301gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc

```

5 (SEQ ID NO:13).

Una alineación de las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular soluble de ActRIIB humano y el dominio extracelular soluble de ActRIIA humano se ilustra en la Figura 1. Esta alineación indica residuos de aminoácidos dentro de ambos receptores que se cree que entran en contacto directamente con ligandos de ActRII. La Figura 2 representa una alineación de múltiples secuencias de diversas proteínas de ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humano. A partir de estas alineaciones, es posible predecir las posiciones de aminoácidos clave dentro del dominio de unión a ligando que son importantes para las actividades de unión ActRII-ligando normales, así como predecir las posiciones de los aminoácidos que es probable que sean tolerantes a sufrir sustitución sin alterar significativamente las actividades de unión ActRII-ligando normales.

15 En otros aspectos, la presente descripción se refiere a polipéptidos de trampa de GDF (también denominados “trampas de GDF”), que se pueden usar, por ejemplo, solos o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis agentes (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios (p. ej., transfusión de glóbulos rojos, sangre entera, terapia de quelación de hierro, tratamiento con hidroxiurea, etc.), para, p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa y/o priapismo), reducir la carga de transfusión de sangre en un sujeto que lo necesita.

30 En algunos aspectos, las trampas de GDF de la presente descripción son variantes de polipéptidos de ActRII solubles (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB) que comprenden una o más mutaciones (p. ej., adiciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos y combinaciones de las mismas) en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido de ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRII de “tipo natural”) de tal manera que la variante de polipéptido de ActRII tiene una o más actividades de unión a ligando alteradas con respecto al polipéptido de ActRII de tipo natural correspondiente. En aspectos preferidos, los polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción conservan al menos una actividad similar a un polipéptido de ActRII de tipo natural correspondiente (p. ej., un polipéptido de ActRIIA o ActRIIB). Por ejemplo, una trampa de GDF se puede unir a, y/o inhibir (p. ej., antagonizar) la función de, uno o más ligandos de ActRII (p. ej., inhibir la activación mediada por ligando de ActRII de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la vía de transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8). En algunos aspectos, las trampas de GDF de la presente descripción se unen a, y/o inhiben, uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, Nodal, GDF8, GDF11, BMP6 y/o BMP7).

45 En ciertos aspectos, los polipéptidos de trampa de GDF de la descripción tienen afinidad de unión elevada por uno o más ligandos de ActRII específicos (p. ej., GDF8, GDF11, BMP6, Nodal y/o BMP7). En otros aspectos, los polipéptidos de trampa de GDF de la descripción tienen afinidad de unión reducida por uno o más ligandos de ActRII específicos (p. ej., activina A, activina B, activina AB, activina C y/o activina E). En otros aspectos más, los polipéptidos de trampa de GDF de la descripción tienen afinidad de unión elevada por uno o más ligandos de ActRII específicos y afinidad de unión reducida por uno o más ligandos de ActRII distintos/diferentes. Por consiguiente, la presente descripción proporciona polipéptidos de trampa de GDF que tienen una especificidad de unión alterada por uno o más ligandos de ActRII.



En ciertos aspectos preferidos, las trampas de GDF de la presente descripción están diseñadas para unirse preferentemente a, y antagonizar, el GDF11 y/o GDF8 (también conocido como miostatina), p. ej., en comparación con un polipéptido de ActRII de tipo natural. Opcionalmente, tales trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 se pueden unir además a, y/o antagonizar, uno o más de Nodal, GDF8, GDF11, BMP6 y/o BMP7. Opcionalmente, tales trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 se pueden unir además a, y/o antagonizar, uno o más de activina B, activina C, activina E, Nodal, GDF8, GDF11, BMP6 y/o BMP7. Opcionalmente, tales trampas de unión a GDF11 y/o GDF8 se pueden unir además a, y/o antagonizar, uno o más de activina A, activina A/B, activina B, activina C, activina E, Nodal, GDF8, GDF11, BMP6 y/o BMP7. En ciertos aspectos, las trampas de GDF de la presente descripción tienen afinidad de unión reducida por las activinas (p. ej., activina A, activina A/B, activina B, activina C, activina E), p. ej., en comparación con un polipéptido de ActRII de tipo natural. En ciertos aspectos preferidos, un polipéptido de trampa de GDF de la presente descripción tiene afinidad de unión reducida por la activina A.

Por ejemplo, la descripción proporciona polipéptidos de trampa de GDF que se unen preferentemente a, y/o antagonizan, el GDF8/GDF11 con respecto a la activina A. Como se demuestra en los Ejemplos de la descripción, tales polipéptidos de trampa de GDF son activadores más potentes de la eritropoyesis *in vivo* en comparación con los polipéptidos de ActRII que conservan afinidad de unión alta por la activina A. Asimismo, estos polipéptidos de trampa de GDF que no se unen a activina A presentan efectos reducidos sobre otros tejidos. Por lo tanto, tales trampas de GDF pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto a la vez que reducen efectos inespecíficos potenciales asociados a la unión/antagonización de activina A. Sin embargo, tales polipéptidos de trampa de GDF selectivos pueden ser menos deseables en algunas aplicaciones donde pueden ser necesarias ganancias más modestas en los niveles de glóbulos rojos para el efecto terapéutico y donde cierto nivel de efecto inespecífico es aceptable (o incluso deseable).

Los residuos de aminoácido de las proteínas ActRIIB (p. ej., E39, K55, Y60, K74, W78, L79, D80 y F101) están en la cavidad de unión a ligando de ActRIIB y ayudan a la unión mediada a sus ligandos, por ejemplo, activina A, GDF11 y GDF8. Por tanto, la presente descripción proporciona polipéptidos de trampa de GDF que comprenden un dominio de unión a ligando (p. ej., un dominio de unión a GDF8/GDF11) alterado de un receptor ActRIIB que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos.

Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener selectividad aumentada para un ligando tal como GDF11 y/o GDF8 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. A modo ilustrativo, se pueden seleccionar una o más mutaciones que aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 y/o GDF8 sobre una o más activinas (activina A, activina B, activina AB, activina C y/o activina A), particularmente activina A. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de  $K_d$  para la unión a activina a  $K_d$  para la unión a GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces superior con respecto a la relación para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de  $CI_{50}$  para la inhibición de activina a  $CI_{50}$  para la inhibición de GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces superior con respecto al dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe el GDF11 y/o GDF8 con una  $CI_{50}$  al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces inferior la  $CI_{50}$  para la inhibición de activina.

Como ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB se puede mutar a un residuo de aminoácido diferente para producir un polipéptido de trampa de GDF que se une preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 con respecto a la SEQ ID NO: 1 se cambia por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: 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 la SEQ ID NO: 1 se puede alterar 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. En cambio, la sustitución de L79 por un aminoácido ácido [un ácido aspártico o ácido glutámico; una sustitución L79D o una L79E] reduce enormemente la afinidad de unión a activina A, mientras que conserva la afinidad de unión a GDF11. En aspectos ejemplares, los procedimientos descritos en esta solicitud utilizan un polipéptido de trampa de GDF que es una variante de polipéptido de ActRIIB que comprende un aminoácido ácido (p. ej., D o E) en la posición que corresponde a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos adicionales.

Como reconocerá un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas en esta solicitud se pueden hacer a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraducciona o síntesis química. Tales técnicas son muy conocidas en la técnica y algunas de ellas se describen en esta solicitud.

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a polipéptidos de ActRII (polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB) que son polipéptidos de ActRII solubles. Como se describe en esta solicitud, el término "polipéptido de ActRII soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRII. El término "polipéptido de ActRII soluble", como se emplea en esta solicitud, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRII, así como cualquier variante de la misma (lo que incluye mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conserva una actividad útil (p. ej., un polipéptido de trampa de GDF como se describe en esta



solicitud). Otros ejemplos de polipéptidos de ActRII solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIA o de trampa de GDF. Por ejemplo, la secuencia señal puede ser una secuencia señal natural de una proteína ActRIIA o ActRIIB, o una secuencia señal de otra proteína, lo que incluye, por ejemplo, una secuencia señal de activador del plasminógeno tisular (APT) o una secuencia señal de melitina de miel de abeja (HBM).

En parte, la presente descripción identifica porciones y variantes funcionalmente activas de polipéptidos de ActRII que se pueden usar como orientación para generar y usar polipéptidos de ActRIIA, polipéptidos de ActRIIB y polipéptidos de trampa de GDF dentro del alcance de los procedimientos descritos en esta solicitud.

Las proteínas ActRII se han caracterizado en la técnica en términos de características estructurales y funcionales, particularmente en lo que respecta a la unión a ligando [véase, p. ej., Attisano y col. (1992) *Cell* 68(1):97-108; Greenwald y col. (1999) *Nature Structural Biology* 6(1): 18-22; Allendorph y coll. (2006) *PNAS* 103(20): 7643-7648; Thompson y col. (2003) *The EMBO Journal* 22(7): 1555-1566 y las patentes de los EE. UU. n.º: 7 709 605, 7 612 041 y 7 842 663].

Por ejemplo, Attisano y col. demostraron que una eliminación del nudo de prolina en el extremo carboxiterminal del dominio extracelular de ActRIIB reducía la afinidad del receptor por la activina. Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la presente SEQ ID NO: 1, "ActRIIB(20-119)-Fc" tiene unión reducida a GDF-11 y activina con respecto a una ActRIIB(20-134)-Fc, que incluye la región de nudo de prolina y el dominio yuxtamembranario completo (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663). Sin embargo, una proteína ActRIIB(20-129)-Fc conserva una actividad similar, aunque algo reducida, con respecto al tipo natural, incluso aunque la región de nudo de prolina esté alterada. Por tanto, los dominios extracelulares de ActRIIB que terminan en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 (con respecto a la presente SEQ ID NO:1) se espera que sean todos activos, pero las construcciones que terminan en el 134 o 133 pueden ser más activas. Similarmente, las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 (con respecto a la SEQ ID NO: 1) no se espera que alteren la afinidad de unión a ligando por márgenes grandes. Para respaldar esto, las mutaciones de P129 y P130 (con respecto a la SEQ ID NO: 1) no reducen sustancialmente la unión a ligando. Por lo tanto, un polipéptido de ActRIIB o un polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB de la presente descripción puede terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, las formas que terminan en, o entre, el 109 y 119 (p. ej., 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 o 119) se espera que tengan unión a ligando reducida. El aminoácido 119 (con respecto a la presente SEQ ID NO: 1) está mal conservado y, por tanto, se altera o trunca fácilmente. Los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB que terminan en el 128 (con respecto a la presente SEQ ID NO: 1) o posterior deberían conservar actividad de unión a ligando. Los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB que terminan en, o entre, el 119 y 127 (p. ej., 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 deseable usar cualquiera de estas formas, en función del entorno clínico o experimental.

En el extremo amínico de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes (con respecto a la presente SEQ ID NO: 1) conservará actividad de unión a ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 (con respecto a la SEQ ID NO: 1) introduce una secuencia de N-glucosilación sin afectar sustancialmente a la unión a ligando (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663). Esto confirma que las mutaciones en la región situada entre el péptido señal de escisión y la región reticulada de cisteína, que corresponde a los aminoácidos 20-29, se toleran bien. En particular, los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 (con respecto a la presente SEQ ID NO: 1) deberían conservar actividad general de unión a ligando, y los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 (con respecto a la presente SEQ ID NO: 1) también se espera que conserven actividad de unión a ligando. Los datos mostrados en esta solicitud, así como en, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663 demuestran que, sorprendentemente, una construcción de ActRIIB que comienza en el 22, 23, 24 o 25 tendrá la actividad máxima.

En conjunto, una porción activa (p. ej., actividad de unión a ligando) de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB de la presente descripción pueden comprender, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una porción de ActRIIB que comienza en un residuo que corresponde a los aminoácidos 20-29 (p. ej., que comienza en los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de la SEQ ID NO: 1 y que termina en una posición que corresponde a los aminoácidos 109-134 (p. ej., que termina en el aminoácido 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 la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, los polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB de la presente descripción no comprenden, o no consisten en, los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1. Otros ejemplos incluyen polipéptidos que comienzan en una posición de 20-29 (p. ej., la posición 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) o 21-29 (p. ej., la posición 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) y terminan en una posición de 119-134 (p. ej., 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134), 119-133 (p. ej., 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133), 129-134 (p. ej., 129, 130, 131, 132, 133 o 134) o 129-133 (p. ej., 129, 130, 131, 132 o 133) de la SEQ ID NO: 1. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan



en una posición de 20-24 (p. ej., 20, 21, 22, 23 o 24), 21-24 (p. ej., 21, 22, 23 o 24) o 22-25 (p. ej., 22, 23 o 25) y terminan en una posición de 109-134 (p. ej., 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 (p. ej., 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134) o 129-134 (p. ej., 129, 130, 131, 132, 133 o 134) de la SEQ ID NO: 1. También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, particularmente las que tienen al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB comprenden un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los residuos de los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, los polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIB no comprenden, o no consisten en, los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1.

La descripción incluye los resultados de un análisis de estructuras de ActRIIB compuestas, mostradas en la Figura 1, que demuestra que la cavidad de unión a ligando está definida, 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 mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus* y, por lo tanto, se tolerarán aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H en esta posición. Por tanto, una fórmula general para un polipéptido de ActRIIB y polipéptido de trampa de GDF a base de ActRIIB de la descripción es una que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, que comienza opcionalmente en una posición que varía de 20-24 (p. ej., 20, 21, 22, 23 o 24) o 22-25 (p. ej., 22, 23, 24 o 25) y que termina en una posición que varía de 129-134 (p. ej., 129, 130, 131, 132, 133 o 134), y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en la cavidad de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 de la cavidad de unión a ligando. Los puntos fuera de la cavidad de unión en los que la variabilidad se puede tolerar particularmente bien, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se señaló anteriormente) y las posiciones 42-46 y 65-73 (con respecto a la SEQ ID NO: 1). Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) mejora realmente la unión a ligando en fondo de A64 y, por tanto, se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión a ligando en el fondo de R64 (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663). Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 del fondo de A64, lo que demuestra, por tanto, que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por tanto, se puede tolerar otro residuo básico, tal como H, en la posición 64 (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663).

ActRIIB se conserva bien en prácticamente todos los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular conservados completamente. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están muy conservados. Por consiguiente, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan una idea de los residuos que se pueden alterar. Por lo tanto, una variante de polipéptido de ActRIIB humano y trampa de GDF a base de ActRIIB activa útil según los procedimientos descritos actualmente pueden incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIB de vertebrado, o pueden incluir un residuo que es similar al de la secuencia humana o de otro vertebrado. Los ejemplos siguientes ilustran esta estrategia para definir una variante de ActRIIB activa. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus* y, por tanto, esta posición se puede alterar y, opcionalmente se puede alterar a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo apolar tal como A. E52 es una K en *Xenopus*, lo que indica que este punto puede tolerar un amplio abanico de cambios, que incluyen residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, con los residuos polares favorecidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e y. F108 es una Y en *Xenopus* y, por lo tanto, se debería tolerar Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L. E111 es K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán residuos cargados en esta posición, lo que incluye D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que se toleran residuos básicos en esta posición, lo que incluye R y H. A en la posición 119 está relativamente mal conservada y se presenta como P en roedores y V en *Xenopus*, por tanto, se debería tolerar esencialmente cualquier aminoácido en esta posición.

Se ha demostrado anteriormente que la adición de un punto de N-glucosilación adicional (N-X-S/T) se tolera bien en lo que respecta a la forma ActRIIB(R64)-Fc (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663). Por lo tanto, las secuencias N-X-S/T generalmente se pueden introducir en posiciones fuera de la cavidad de unión a ligando definida en la Figura 1 del polipéptido de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB de la presente descripción. Los puntos particularmente 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 la SEQ ID NO:1). Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el enlazador entre la secuencia de ActRIIB y un dominio Fc u otro componente de fusión. Tal punto se puede introducir con un esfuerzo mínimo introduciendo una N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistentes, o introduciendo una S o T en una posición que corresponde a una N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearían un punto de N-glucosilación son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinadas con una alteración N65A), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T (con respecto a la SEQ ID NO:1). Cualquier S que se prevé que se va a glucosilar se puede alterar a una T sin crear un punto inmunogénico, debido a la protección proporcionada por la glucosilación. Asimismo, cualquier T que se prevé que se



va a glucosilar se puede alterar a una S. Por tanto, las alteraciones S67T y S44T (con respecto a la SEQ ID NO: 1) están contempladas. Asimismo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. Por consiguiente, un polipéptido de ActRIIB y una trampa de GDF a base de ActRIIB de la presente descripción pueden ser una variante que tiene una o más secuencias consenso de N-glucosilación no endógenas adicionales como se describió anteriormente.

Las variaciones descritas en esta solicitud se pueden combinar de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descrito en esta solicitud indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que a menudo es beneficioso conservar. Con respecto a la SEQ ID NO: 1, estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), posición 78 (hidrófobo, y particularmente triptófano), posición 37 (ácido, y particularmente ácido aspártico o glutámico), posición 56 (aminoácido básico), posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por tanto, en los polipéptidos de ActRIIB y las trampas de GDF a base de ActRIIB descritos en esta solicitud, la descripción proporciona una estructura de aminoácidos que se puede conservar. Otras posiciones que puede ser deseable conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K), todas con respecto a la SEQ ID NO: 1.

Una fórmula general para un polipéptido de ActRIIA activo (p. ej., de unión a ligando) es una que comprende un polipéptido que comienza en el aminoácido 30 y termina en el aminoácido 110 de la SEQ ID NO: 9. Por consiguiente, los polipéptidos de ActRIIA y las trampas de GDF a base de ActRIIA de la presente descripción pueden comprender un polipéptido que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 30-110 de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, las trampas de GDF a base de ActRIIA de la presente descripción no comprenden, o no consisten en, los aminoácidos 30-110 de la SEQ ID NO: 9. Opcionalmente, los polipéptidos de ActRIIA y polipéptidos de trampa de GDF a base de ActRIIA de la presente descripción comprenden un polipéptido que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 12-82 de la SEQ ID NO: 9 que comienza opcionalmente en una posición que varía de 1 a 5 (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5) o 3-5 (p. ej., 3, 4 o 5) y que termina en una posición que varía de 110-116 (p. ej., 110, 111, 112, 113, 114, 115 o 116) o 110-115 (p. ej., 110, 111, 112, 113, 114 o 115), respectivamente, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en la cavidad de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 de la cavidad de unión a ligando con respecto a la SEQ ID NO: 9.

En ciertos aspectos, se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos de ActRII (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB) y polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción cribando polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF (p. ej., SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42, 46 y 48). Además, se pueden sintetizar químicamente fragmentos usando técnicas conocidas en la técnica, tales como síntesis química con f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o mediante síntesis química) y ensayar para identificar los fragmentos peptídico que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de receptores ActRII y/o uno o más ligandos de ActRII (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal).

En algunos aspectos, un polipéptido de ActRIIA de la presente descripción es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26, y 28. En ciertos aspectos, el polipéptido de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26 y 28. En ciertos aspectos, el polipéptido de ActRIIA consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26 y 28.

En algunos aspectos, un polipéptido de ActRIIB de la presente descripción es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29, 31 y 49. En ciertos aspectos, el polipéptido de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29, 31 y 49. En ciertos aspectos, el polipéptido de ActRIIB consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29, 31 y 49.

En algunos aspectos, un polipéptido de trampa de GDF de la presente descripción es una variante de polipéptido de ActRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 41, 44, 45, 49, 50 y 51. En ciertos aspectos, la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 41, 44, 45, 49, 50 y 51. En ciertos aspectos, la trampa de GDF comprende una



- secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 41, 44, 45, 49, 50 y 51, donde la posición que corresponde a L79 de la SEQ ID NO: 1, 4 o 49 es un aminoácido ácido (un residuo de aminoácido D o E). En ciertos aspectos, la trampa de GDF consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia
- 5 de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 36, 37, 38, 41, 44, 45, 50 y 51. En ciertos aspectos, la trampa de GDF no comprende, o no consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 29 y 31.
- 10 En algunos aspectos, un polipéptido de trampa de GDF de la presente descripción es una variante de polipéptido de ActRIIA que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26, 28, 29 y 31. En ciertos aspectos, la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26, 28, 29 y 31. En
- 15 ciertos aspectos, la trampa de GDF consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26, 28, 29 y 31. En ciertos aspectos, la trampa de GDF no comprende, o no consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 22, 26, 28, 29 y 31.
- 20 En algunos aspectos, la presente descripción contempla fabricar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido de ActRII (p. ej., polipéptido de ActRIIA o ActRIIB) o una trampa de GDF para fines tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (p. ej., semivida *ex vivo* o resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Las variantes se pueden producir mediante sustitución, eliminación o adición de aminoácidos o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un
- 25 aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente (p. ej., mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la descripción da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar
- 30 fácilmente evaluando la capacidad de la variante de polipéptido para producir una respuesta en las células de una manera similar al polipéptido de tipo natural, o para unirse a uno o más ligandos, tales como GDF11, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF8, BMP6 y BMP7, en comparación con el polipéptido no modificado o de tipo natural.
- 35 En ciertos aspectos, la presente descripción contempla mutaciones específicas de polipéptidos de ActRII y polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción para alterar la glucosilación del polipéptido. Tales mutaciones se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más puntos de glucosilación, tales como puntos de O-glucosilación o N-glucosilación. Los puntos de reconocimiento de la glucosilación en asparagina generalmente comprenden una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (en la que "X" es cualquier aminoácido) que es
- 40 reconocida específicamente por las enzimas de glucosilación celular apropiadas. La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido (para puntos de O-glucosilación). Un abanico de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácido de un punto de reconocimiento de la glucosilación (y/o eliminación de aminoácidos en la segunda posición) dan como resultado la ausencia de glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro
- 45 medio para aumentar el número de restos carbohidrato en un polipéptido es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. En función del modo de acoplamiento usado, el uno o más glúcidos se pueden fijar a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. La retirada de uno o más restos carbohidrato
- 50 presentes en un polipéptido se puede lograr 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 da como resultado la escisión de la mayor parte o la totalidad de los glúcidos a excepción del glúcido enlazador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) a la vez que deja la secuencia de aminoácidos intacta. La escisión enzimática de restos carbohidrato en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de un abanico
- 55 de endo- y exoglucosidasas como describen Thotakura y col. [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]. La secuencia de un polipéptido se puede ajustar, según proceda, en función del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto o vegetales pueden introducir patrones de glucosilación diferentes que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos de ActRII y polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción para uso en seres humanos se pueden expresar en una estirpe celular de mamífero
- 60 que proporciona la glucosilación correcta, tal como las estirpes celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras estirpes celulares de expresión de mamífero también sean útiles.

Esta descripción contempla además un procedimiento para generar mutantes, particularmente conjuntos de mutantes combinatorios de polipéptidos de ActRII y polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción, así como

65 mutantes de truncamiento. Los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias



de ActRII y trampa de GDF. El fin de cribar tales colecciones combinatorias puede ser el de generar, por ejemplo, variantes de polipéptido que tienen propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada o unión a ligando alterada. A continuación, se proporciona un abanico de ensayos de cribado, y tales ensayos se pueden usar para evaluar variantes. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRII y polipéptidos de trampa de GDF se pueden cribar para

5 determinar su capacidad para unirse a un receptor ActRII, de impedir la unión de un ligando de ActRII (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP7, BMP6 y/o Nodal) a un polipéptido de ActRII, o de interferir con la transducción de señales provocada por un ligando de ActRII.

La actividad de los polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF también se puede ensayar en un ensayo

10 a base de células o *in vivo*. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF sobre la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Esto se puede realizar, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas de ligando de ActRII recombinantes (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP7, BMP6 y/o Nodal), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF y, opcionalmente, un ligando de ActRII. Asimismo, se puede

15 administrar un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF a un ratón u otro animal y se pueden evaluar una o más mediciones en sangre, tales como un recuento de RBC, hemoglobina o un recuento de reticulocitos, usando procedimientos reconocidos en la técnica.

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o generalmente

20 aumentada con respecto a un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF de referencia. Tales variantes, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, se pueden usar en protocolos de genoterapia. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes al polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF no modificados correspondientes. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que

25 dan como resultado la destrucción, o inactivación de otro modo, de un polipéptido no modificado. Tales variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF 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 de polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF recombinantes dentro de la célula. En una

30 proteína de fusión a Fc, se pueden hacer mutaciones en el enlazador (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una colección combinatoria por medio de una genoteca degenerada que codifica una colección de polipéptidos que incluyen cada uno al menos una porción de secuencias de ActRII o trampa de GDF potenciales. Por

35 ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se puede ligar enzimáticamente a secuencias genéticas de tal manera que el conjunto degenerado de secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptido de ActRII o trampa de GDF potenciales sean expresables como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (p. ej., para presentación en fagos).

Hay muchas maneras mediante las que se puede generar la colección de homólogos potenciales a partir de una

40 secuencia de oligonucleótido degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos se pueden ligar a continuación en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es muy conocida en la técnica (véase, p. ej., Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura y col. (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos.

45 Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier páginas 273-289; Itakura y col. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura y col. (1984) Science 198:1056; Ike y col. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477. Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas. Véase, p. ej., Scott y col., (1990) Science 249:386-390; Roberts y col. (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin y col. (1990) Science 249: 404-406; Cwirla y col., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las patentes de los EE. UU. n.º: 5 223 409, 5 198 346 y 5 096 815.

Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una colección combinatoria. Por

50 ejemplo, los polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción se pueden generar a partir de una colección cribando mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida por barrido de alanina [véase, p. ej., Ruf y col. (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint y col. (1993) Gene

55 137:109-118; Grodberg y col. (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman y col. (1991) Biochemistry 30:10832-10838 y Cunningham y col. (1989) Science 244:1081-1085], mediante mutagénesis dirigida barrido de enlazador [véase, p. ej., Gustin y col. (1993) Virology 193:653-660; y Brown y col. (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight y col. (1982) Science 232:316], mediante mutagénesis por saturación [véase, p. ej., Meyers y col., (1986) Science 232:613]; mediante mutagénesis por dirigida por PCR [véase,

60 p. ej., Leung y col. (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19]; o mediante mutagénesis aleatoria, lo que incluye mutagénesis química [véase, p. ej., Miller y col. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY y Greener y col. (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34]. La mutagénesis dirigida por barrido de enlazador, particularmente en un entorno combinatorio, es un procedimiento atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos de ActRII.



Se conoce un abanico de técnicas en la técnica para cribar productos genéticos de colecciones combinatorias fabricadas mediante mutaciones y truncamientos puntuales y, por ende, para cribar genotecas de ADNc para seleccionar productos genéticos que tienen una cierta propiedad. Tales técnicas serán generalmente adaptables para el cribado rápido de las genotecas generadas mediante la mutagénesis combinatoria de polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF de la descripción. Las técnicas usadas más ampliamente para cribar genotecas grandes comprenden típicamente clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la colección de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a ligando de ActRII (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP7, BMP6 y/o Nodal) y/o ensayos de transducción de señales celulares mediada por ligando de ActRII.

En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF de la descripción pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera de las que están presente de forma natural en el polipéptido de ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRIIA o ActRIIB) o polipéptido de trampa de GDF. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, el polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF puede contener elementos no aminoacídicos, tales como polietilenglicoles, lípidos, polisacáridos o monosacáridos, y fosfatos. Los efectos de tales elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de un polipéptido de trampa de ligando se pueden ensayar como se describe en esta solicitud para otras variantes de ActRII o trampa de GDF. Cuando se produce un polipéptido de la descripción en células escindiendo una forma incipiente del polipéptido, el procesamiento postraducciona también puede ser importante para el plegamiento y/o la función correctos de la proteína. Diferentes células (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF.

En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRII o polipéptidos de trampa de GDF de la presente descripción incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción (dominio) de un polipéptido de ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRIIA o ActRIIB) o polipéptido de trampa de GDF y una o más porciones (dominios) heterólogas. Los ejemplos muy conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Con fines de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con parejas de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de trampa de ligando. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP), así como "epítomos de identificación", que normalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Los epítomos de identificación muy conocidos para los que se dispone fácilmente de anticuerpos monoclonales específicos incluyen epítomos FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un punto de escisión de proteasas, tal como para el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y libere de ese modo las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas se pueden aislar a continuación del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertos aspectos preferidos, un polipéptido de ActRII o un polipéptido de trampa de GDF se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumenta la semivida en suero, independientemente de si esto se debe a destrucción reducida, depuración reducida por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a un amplio abanico de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (p. ej., dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento muscular).

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona proteínas de fusión de ActRII o trampa de GDF que comprenden la secuencia del dominio Fc de IgG1 siguiente:



1THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE  
 51VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK  
 101VSNKALPVPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF  
 151YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV  
 201FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:14).

En otros aspectos, la presente descripción proporciona proteínas de fusión de ActRII o trampa de GDF que comprenden la variante del dominio Fc de IgG1 siguiente:

5

1THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE  
 51VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK  
 101VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF  
 151YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV  
 201FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:64)

En otros aspectos más, la presente descripción proporciona proteínas de fusión de ActRII o trampa de GDF que comprenden la variante del dominio Fc de IgG1 siguiente:

10

1THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVD(A) VSHEDPE  
 51VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK(A)  
 101VSNKALPVPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF  
 151YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG PFFLYSKLTV DKSRWQQGNV  
 201FSCSVMHEAL HN(A) HTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:15).

Opcionalmente, el dominio Fc de IgG1 tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc de IgG1 mutante que tiene una o más de esas mutaciones (p. ej., mutación Asp-265) tiene capacidad de unión reducida al receptor Fcy con respecto a un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (p. ej., mutación Asn-434) tiene capacidad de unión aumentada al receptor Fc (FcRN) relacionado con el MHC de clase I con respecto a un dominio Fc de IgG1 de tipo natural.

En ciertos otros aspectos, la presente descripción proporciona proteínas de fusión de ActRII o trampa de GDF que comprenden variantes del dominio Fc de IgG2, que incluyen lo siguiente:

1VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ  
 51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS  
 101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP  
 151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPM L DSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS  
 201 CSVMHEALHN HTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO:65)

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un dominio de polipéptido de ActRII o dominio de polipéptido de trampa de GDF se puede colocar en el extremo carboxiterminal a un dominio heterólogo o, alternativamente, un



dominio heterólogo se puede colocar en el extremo carboxiterminal a un polipéptido de trampa de GDF. El dominio de polipéptido de ActRII o dominio de polipéptido de trampa de GDF y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales carboxi- o aminoterminal a cualquier dominio o entre los dominios.

5

Por ejemplo, una proteína de fusión de ActRII o trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C. La porción B corresponde a un dominio de polipéptido de ActRII o un dominio de polipéptido de trampa de GDF. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y las porciones tanto A como C, cuando están presentes, son heterólogas a B. Las porciones A y/o C se pueden fijar a la porción B a través de una secuencia de enlazador. Los enlazadores ejemplares incluyen enlazadores polipeptídicos cortos tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de glicina, tal como, por ejemplo, un enlazador Gly-Gly-Gly. Otros enlazadores adecuados se describieron anteriormente en esta solicitud [p. ej., un enlazador TGGG (SEQ ID NO: 53)]. En ciertos aspectos, una proteína de fusión de ActRII o trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C, donde A es una secuencia líder (señal), B consiste en un dominio de polipéptido de ActRII o GDF y C es una porción de polipéptido que mejora una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, absorción/administración, ubicación o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación. En ciertos aspectos, una proteína de fusión de ActRII o trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C, donde A es una secuencia líder de TPA, B consiste en un dominio de polipéptido de ActRII o GDF y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión preferidas comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26, 29, 31, 36, 38, 41, 44 y 51.

En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRII o trampa de GDF de la presente descripción contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida *in vitro* de los polipéptidos, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos y/o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un dominio de polipéptido de ActRII o un dominio de trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un punto de glucosilación (que incluyen, por ejemplo, la adición de un punto de glucosilación a un polipéptido de la descripción) y modificaciones de restos carbohidrato (que incluyen, por ejemplo, la retirada de restos carbohidrato de un polipéptido de la descripción). Como se emplea en esta solicitud, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (p. ej., 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 carbohidrato, o resto no proteico, tal como polietilenglicol.

En aspectos preferidos, los polipéptidos de ActRII y las trampas de GDF que se van a usar según los procedimientos descritos en esta solicitud son polipéptidos aislados. Como se emplea en esta solicitud, una proteína o un polipéptido aislado es uno que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción se purifica hasta más de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de pureza como se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (p. ej., SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (p. ej., HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Los procedimientos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos son muy conocidos en la técnica [véase, p. ej., Flatman y col., (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87].

En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRII y las trampas de GDF de la descripción se pueden producir mediante un abanico de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos de la descripción se pueden sintetizar usando técnicas de química proteica estándar, tales 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, se comercializan sintetizadores peptídicos automatizados (véase, p. ej., Advanced Chemtech Modelo 396; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, los polipéptidos de la descripción, lo que incluye fragmentos o variantes de los mismos, se pueden producir recombinantemente usando diversos sistemas de expresión [p. ej., E. coli, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus], como se sabe bien en la técnica. En un aspecto adicional, los polipéptidos modificados o no modificados de la descripción se pueden producir mediante digestión de polipéptidos de ActRII o trampa de GDF de longitud completa producidos recombinantemente usando, por ejemplo, una proteasa, p. ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima convertidora de aminoácidos básicos emparejados (PACE). Se puede usar análisis informático (usando un software comercializado, p. ej., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar puntos de escisión proteolítica. Alternativamente, tales polipéptidos se pueden producir a partir de polipéptidos de ActRII o trampa de GDF de longitud completa producidos recombinantemente usando escisión química (p. ej., bromuro de cianógeno, hidroxilamina, etc.).

Cualquiera de los polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA o ActRIIB) se puede combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar el rojo niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, un polipéptido de ActRII descrito en esta solicitud se puede usar en combinación con i) uno o más polipéptidos de ActRII adicionales descritos en esta solicitud, ii) una o más trampas de GDF descritas en esta solicitud; iii) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-activina A, un anticuerpo



anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA y/o un anticuerpo anti-ActRIIB); iv) uno o más antagonistas de ActRII de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); v) uno o más de los antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA, y/o ActRIIB); vi) uno o más polipéptidos de folistatina descritos en esta solicitud; y/o vii) uno o más polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud.

- 10 Similarmente, cualquiera de las trampas de GDF descritas en esta solicitud se puede combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un paciente que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, una trampa de descrita en esta solicitud se puede usar en combinación con i) una o más trampas de GDF adicionales descritas en esta solicitud, ii) uno o más polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA o ActRIIB); iii) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-activina A, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA y/o un anticuerpo anti-ActRIIB); iv) uno o más antagonistas de ActRII de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); v) uno o más de los antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA, y/o ActRIIB); vi) uno o más polipéptidos de folistatina descritos en esta solicitud; y/o vii) uno o más polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud.

25

#### **B. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de ActRII y trampas de GDF**

- En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican los polipéptidos de ActRII y los polipéptidos de trampa de GDF (lo que incluye fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión de los mismos) descritos en esta solicitud. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 12 codifica el polipéptido precursor de ActRIIA humano de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 13 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIA. Además, la SEQ ID NO: 7 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB humano de origen natural (la variante R64 descrita anteriormente), mientras que la SEQ ID NO: 8 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIB (la variante R64 descrita anteriormente). Los ácidos nucleicos objetivo pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en procedimientos para fabricar polipéptidos de trampa de ligando a base de ActRII de la presente descripción.

- Como se emplea en esta solicitud 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 ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

- En ciertos aspectos, la expresión ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de ActRII y trampas de GDF de la presente descripción se entiende que incluye ácidos nucleicos que son variantes de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42, 43, 46, 47 y 48. Las variantes de secuencias de nucleótidos incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, lo que incluye variantes alélicas, y, por lo tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos designada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42, 43, 46, 47 y 48.

- En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRII y las trampas de GDF de la presente descripción están codificados por secuencias de ácidos nucleicos aislados o recombinantes que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42, 43, 46, 47 y 48. En algunos aspectos, las trampas de GDF de la presente descripción no están codificadas por secuencias de ácidos nucleicos que comprenden, o consisten en, una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que corresponden a una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27 y 32. Un experto en la materia apreciará que las secuencias de ácidos nucleicos que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias complementarias a las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 42, 47 y 48, y las variantes de las mismas, también están dentro del alcance de la presente descripción. En aspectos adicionales, las secuencias de ácidos nucleicos de la descripción se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una genoteca.

- En otros aspectos, los ácidos nucleicos de la presente descripción también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42, 43, 46, 47 y 48, las secuencias complementarias de SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42,



43, 46, 47 y 48, o fragmentos de las mismas. Como se comentó anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación de ADN se pueden variar. Un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación de ADN se pueden variar. 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 salina en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C hasta una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede aumentar de condiciones de rigurosidad baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de rigurosidad alta a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar, o la temperatura o la concentración salina se pueden mantener constantes mientras se cambia la otra variable. En un aspecto, la descripción proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de rigurosidad baja de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 27, 32, 39, 40, 42, 43, 46, 47 y 48, debido a la degeneración en el código genético, también se encuentran dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan mediante más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina), pueden dar como resultado mutaciones "imperceptibles" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objetivo existan entre las células de mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas tales variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes se encuentran dentro del alcance de esta descripción.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos recombinantes de la presente descripción se pueden enlazar operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula hospedadora usada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para un abanico de células hospedadoras. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, puntos de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. La descripción contempla los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión se puede insertar en un cromosoma. En algunos aspectos, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores seleccionables son muy conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.

En ciertos aspectos de la presente descripción, el ácido nucleico objetivo se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ActRII o una trampa de GDF y enlazados operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de ActRII o trampa de GDF. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Las secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de un amplio abanico de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando están enlazadas operativamente a ella en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ActRII o trampa de GDF. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor *tet*, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema lac, el sistema *trp*, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la T7 ARN polimerasa, las principales regiones operadoras y promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de la envoltura de fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, p. ej., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento  $\alpha$  de la levaduras, el promotor de poliedros del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos. Se debe entender 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. Asimismo, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores de antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante de la presente descripción se puede producir ligando el gen clonado, o una porción del mismo, a un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero) o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de ActRII o trampa de GDF recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los



tipos siguientes: 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*.

- 5 Algunos vectores de expresión de mamífero 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 mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (VPB-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) se pueden usar para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (lo que incluye los retrovíricos) se pueden encontrar más adelante en la descripción de sistemas de administración de genoterapia. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son muy conocidos en la técnica. Para consultar otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase, p.ej., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos aspectos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tal como el pBlueBac III que contiene  $\beta$ -gal).

En un aspecto preferido, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de ActRII o trampa de GDF objetivo 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 genéticas objetivo se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos de ActRII objetivo en células propagadas en cultivo, p. ej., para producir proteínas, lo que incluye proteínas de fusión o variantes de proteínas, para purificación.

Esta descripción se refiere también a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante para uno o más de los polipéptidos de ActRII o trampa de GDF objetivo. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ActRII o trampa de GDF de la descripción se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (p. ej., usando un sistema de expresión de baculovirus), células de levadura o de mamífero [p. ej., una estirpe de células de ovario de hámster chino (CHO)]. Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere además a procedimientos para producir los polipéptidos de ActRII o trampa de GDF objetivo. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRII o trampa de GDF se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido de ActRII o trampa de GDF. El polipéptido puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido. Alternativamente, el polipéptido de ActRII o trampa de GDF se puede conservar citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recoger, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son muy conocidos en la técnica. Los polipéptidos objetivo se pueden aislar del medio de cultivo celular, las células hospedadoras, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de ActRII y trampa de GDF, y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido de ActRII o trampa de GDF (p. ej., se puede usar una columna de proteína A para purificar una proteína de fusión ActRII-Fc o trampa de GDF-Fc). En algunos aspectos, el polipéptido de ActRII o trampa de GDF es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

En algunos aspectos, la purificación se consigue mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en columna de Q Sepharose, cromatografía en columna de fenilsefaraosa, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración vírica e intercambio de tampón. Una proteína ActRII-Fc o trampa de GDF-Fc se puede purificar hasta una pureza de >90 %, >95 %, >96 %, >98 % o >99 % como se determina mediante cromatografía de exclusión molecular y >90 %, >95 %, >96 %, >98 % o >99 % como se determina mediante SDS PAGE. El nivel objetivo de pureza debe ser uno que sea suficiente para conseguir resultados deseables en sistemas de mamífero, particularmente de primates no humanos, roedores (ratones) y seres humanos.

En otro aspecto, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de un punto de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo aminico de la porción deseada del polipéptido de ActRII o trampa



de GDF recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina metálica de  $\text{Ni}^{2+}$ . La secuencia líder de purificación se puede retirar posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido de ActRII o trampa de GDF purificado. Véase, p. ej., Hochuli y col. (1987) *J. Chromatography* 411:177 y Janknecht y col. (1991) *PNAS USA* 88:8972.

- 5 Las técnicas para fabricar genes de fusión son muy conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o irregulares para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según proceda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseables y ligadura enzimática. En otro aspecto, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos genéticos se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos genéticos consecutivos que posteriormente se pueden hibridar para generar una secuencia genética quimérica. Véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 15 1992.

### C. Antagonistas de anticuerpos

- En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que antagoniza la actividad de ActRII (p. ej., la inhibición de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8). Tales anticuerpos se pueden unir a e inhibir uno o más ligandos de la familia TGF- $\beta$  (p. ej., GDF8, GDF11, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7 o Nodal) o uno o más receptores de la familia TGF- $\beta$  (p. ej., ActRIIA, ActRIIB, ALK4 o ALK5) particular, la descripción proporciona procedimientos para usar un antagonista de ActRII de anticuerpos o una combinación de antagonistas de ActRII de anticuerpos, solo o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios [p. ej., transfusión de glóbulos rojos o sangre entera, terapia de quelación de hierro, tratamiento con hidroxiurea, etc.], para, p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesite, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosas, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo) y/o reducir la carga de transfusión de sangre en un sujeto que lo necesita.

- En ciertos aspectos, un antagonista de ActRII de anticuerpos preferido de la descripción es un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que se une a, y/o inhibe la actividad de, al menos el GDF11 (p. ej., la activación mediada por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, el anticuerpo, o la combinación de anticuerpos, se une además a, y/o inhibe la actividad de, el GDF8 (p. ej., la activación mediada por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3), particularmente en el caso de un anticuerpo multiespecífico que tiene afinidad de unión tanto por el GDF11 como por el GDF8 o en el contexto de una combinación de uno o más anticuerpos anti-GDF11 y uno o más anticuerpos anti-GDF8. Opcionalmente, un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, de la descripción no se une sustancialmente a, y/o inhibe la actividad de, la activina A (p. ej., la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). En algunos aspectos, un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, de la descripción que se une a, y/o inhibe la actividad de, el GDF11 y/o GDF8 se une además a, y/o inhibe la actividad de, uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal (p. ej., la activación de la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8 de ActRIIA o ActRIIB), particularmente en el caso de un anticuerpo multiespecífico que tiene afinidad de unión por múltiples ligandos de ActRII o en el contexto de una combinación de múltiples anticuerpos que tienen cada uno afinidad de unión por un ligando de ActRII diferente.

- En ciertos aspectos, un antagonista de ActRII de la presente descripción es un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que se une a, y/o inhibe la actividad de, al menos el GDF8 (p. ej., la activación mediada por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, el anticuerpo, o la combinación de anticuerpos, se une además a, y/o inhibe la actividad de, el GDF11 (p. ej., la activación mediada por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3), particularmente en el caso de un anticuerpo multiespecífico que tiene afinidad de unión tanto por el GDF8 como por el GDF11 o en el contexto de una combinación de uno o más anticuerpos anti-GDF8 y uno o más anticuerpos anti-GDF11. Opcionalmente, un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, de la descripción no se une sustancialmente a, y/o inhibe la actividad de, la activina A (p. ej., la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). En algunos aspectos, un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, de la descripción que se une a, y/o inhibe



la actividad de, el GDF8 y/o GDF11 se une además a, y/o inhibe la actividad de, una o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal (p. ej., la activación de la transducción de señales de ActRIIA o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8), particularmente en el aspecto de un anticuerpo multiespecífico que tiene afinidad de unión por múltiples ligandos de ActRII o en el contexto de una combinación de múltiples anticuerpos, que tienen cada uno afinidad de unión por un ligando de ActRII diferente.

En otro aspecto, un antagonista de ActRII de la presente descripción es un anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que se une a, y/o inhibe la actividad de, un receptor ActRII (p. ej., un receptor ActRIIA o ActRIIB). En aspectos preferidos, un anticuerpo anti-receptor ActRII (p. ej., un anticuerpo antirreceptor ActRIIA o anti-ActRIIB), o una combinación de anticuerpos, de la descripción se une a un receptor ActRII e impide la unión y/o activación del receptor ActRII por al menos el GDF11 (p. ej., la activación mediada por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, un anticuerpo antirreceptor ActRII, o una combinación de anticuerpos, de la descripción impide además la unión y/o activación del receptor ActRII por el GDF8. Opcionalmente, un anticuerpo antirreceptor de ActRII, o una combinación de anticuerpos, de la descripción no inhibe sustancialmente la unión a, y/o activación de, un receptor ActRII por la activina A. En algunos aspectos, un anticuerpo antirreceptor ActRII, o una combinación de anticuerpos, de la descripción que se une a un receptor ActRII e impide la unión y/o activación del receptor ActRII por el GDF11 y/o GDF8 impide además la unión y/o activación del receptor ActRII por uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal.

El término anticuerpo se emplea en esta solicitud en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada. Un fragmento de anticuerpo se refiere a una molécula que no es un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto y que se une a antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (p. ej., scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Véase, p. ej., Hudson y col. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Plückthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 269-315 (1994); WO 93/16185 y las patentes de los EE. UU. n.º 5 571 894, 5 587 458 y 5 869 046. Los anticuerpos descritos en esta solicitud pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. En ciertos aspectos, los anticuerpos de la presente descripción comprenden un marcador fijado a los mismos y capaz de ser detectado (p. ej., el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). En aspectos preferidos, los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos aislados.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos puntos de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, p. ej., los documentos EP 404 097; WO 1993/01161; Hudson y col. (2003) Nat. Med. 9:129-134 (2003) y Hollinger y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen también en Hudson y col. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden toda o una porción del dominio variable de cadena pesada o toda o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos aspectos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6 248 516.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden fabricar mediante diversas técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción mediante células hospedadoras recombinantes (p. ej., E. coli o fagos), como se describe en esta solicitud.

Los anticuerpos de esta solicitud 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. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. 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 uso en los procedimientos descritos en esta solicitud se une específicamente a su antígeno diana, preferiblemente con afinidad de unión alta. La afinidad se puede expresar como un valor de K<sub>D</sub> y refleja la afinidad de unión intrínseca (p. ej., con efectos de avidéz minimizados). Típicamente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, ya sea en un entorno exento de células o asociado a células. Se puede usar cualquiera de varios ensayos conocidos en la técnica, lo que incluye los descritos en esta solicitud, para obtener mediciones de afinidad de unión que incluyen, por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales (ensayo Biacore™), ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) y ELISA. En algunos aspectos, los anticuerpos de la presente descripción se unen a sus antígenos diana (p. ej., GDF-11, GDF8, ActRIIA, ActRIIB, etc.) con al menos una K<sub>D</sub> de 1 x 10<sup>-7</sup> o más fuerte, 1 x 10<sup>-8</sup> o más fuerte, 1 x 10<sup>-9</sup> o más fuerte, 1 x 10<sup>-10</sup> o más fuerte, 1 x 10<sup>-11</sup> o más fuerte, 1 x 10<sup>-12</sup> o más fuerte, 1 x 10<sup>-13</sup> o más fuerte o 1 x 10<sup>-14</sup> o más fuerte.



En ciertos aspectos, la  $K_D$  se mide mediante RIA realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno diana como describe el ensayo siguiente. La afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno radiomarcado (p. ej., marcado con  $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, capturando a continuación el antígeno unido con una placa revestida con anticuerpos anti-Fab [véase, p. ej., Chen y col. (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. Para establecer las condiciones para el ensayo, se revisten placas de múltiples pocillos (p. ej., MICROTITER® de Thermo Scientific) (p. ej., durante la noche) con un anticuerpo anti-Fab de captura (p. ej., de Cappel Labs) y posteriormente se bloquean con albúmina sérica bovina, preferiblemente a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente, se mezcla antígeno radiomarcado con diluciones en serie de un Fab de interés [p. ej., compatible con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y col., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]. El Fab de interés se incubaba a continuación, preferiblemente durante la noche, pero la incubación puede continuar durante un periodo más largo (p. ej., aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación, preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. A continuación, se retira la solución y la placa se lava varias veces, preferiblemente con mezcla de polisorbato 20 y PBS. Cuando las placas han secado, se añade centelleador (p. ej., MICROSCINT® de Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma (p. ej., TOPCOUNT® de Packard).

Según otro aspecto, la  $K_D$  se mide usando ensayos de resonancia de plasmones superficiales con, por ejemplo, un BIACORE® 2000 o BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) con chips CM5 de antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. Por ejemplo, el antígeno se puede diluir con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 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 (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie a la mitad de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 % de tensioactivo de polisorbato 20 (TWEEN-20®) (PBST) a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{as}$ ) y las velocidades de disociación ( $k_{dis}$ ) se calculan usando, por ejemplo, un modelo de unión de Langmuir individual sencillo (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) se calcula como la relación  $k_{dis}/k_{as}$  [véase, p. ej., Chen y col., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. Si la velocidad de asociación supera, por ejemplo,  $10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (p. ej., excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se miden en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO® serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Como se emplea en esta solicitud, anticuerpo anti-GDF11 generalmente se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a GDF11 con afinidad suficiente, de tal manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o agente terapéutico en el direccionamiento a GDF11. En ciertos aspectos, el grado de unión de un anticuerpo anti-GDF11 a una proteína distinta del GDF11 no relacionada es inferior a aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o inferior a 1 % de la unión del anticuerpo a GDF11 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-GDF11 se une a un epítipo de GDF11 que se conserva entre GDF11 de diferentes especies. En ciertos aspectos preferidos, un anticuerpo anti-GDF11 de la presente descripción es un anticuerpo antagonista que puede inhibir la actividad del GDF11. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF11 de la descripción puede inhibir la unión de GDF11 a un receptor análogo (p. ej., receptor ActRIIA o ActRIIB) y/o inhibir la (activación de la) transducción de señales mediada por GDF11 de un receptor análogo, tal como la transducción de señales a través de SMAD2/3 por receptores ActRIIA y/o ActRIIB. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-GDF11 de la presente descripción no se unen sustancialmente a, y/o inhiben la actividad de, la activina A. Cabe señalar que el GDF11 tiene homología de secuencia alta con el GDF8 y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a, y/o inhiben, el GDF11, en algunos casos, también se pueden unir a, y/o inhibir, el GDF8.

Un anticuerpo anti-GDF8 se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a GDF8 con afinidad suficiente, de tal manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o agente terapéutico en el direccionamiento a GDF8. En ciertos aspectos, el grado de unión de un anticuerpo anti-GDF8 a una proteína distinta de GDF8 no relacionada es inferior a aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o inferior a 1 % de la unión del anticuerpo a GDF8 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-GDF8 se une a un epítipo de GDF8 que se conserva entre GDF8 de diferentes especies. En aspectos preferidos, un anticuerpo anti-GDF8 de la presente descripción es un anticuerpo antagonista que puede inhibir la actividad del GDF8. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF8 de la descripción puede inhibir la unión de GDF8 a un receptor análogo (p. ej., receptor ActRIIA o ActRIIB) y/o inhibir la (activación de la) transducción de señales mediada por GDF8 de un receptor análogo, tal como la transducción de señales a través de SMAD2/3 por receptores ActRIIA y/o ActRIIB. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-GDF8 de la presente descripción no se unen sustancialmente a, y/o inhiben la actividad



de, la activina A. Cabe señalar que el GDF8 tiene homología de secuencia alta con el GDF11 y, por lo tanto, los anticuerpos que se unen a, y/o inhiben, el GDF8, en muchos casos, también se pueden unir a, y/o inhibir, el GDF11.

Un anticuerpo anti-ActRIIA se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a ActRIIA con afinidad suficiente, de tal manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o agente terapéutico en el direccionamiento a ActRIIA. En ciertos aspectos, el grado de unión de un anticuerpo anti-ActRIIA a una proteína distinta de ActRIIA no relacionada es inferior a aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o inferior a 1 % de la unión del anticuerpo a ActRIIA como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-ActRIIA se une a un epítipo de ActRIIA que se conserva entre ActRIIA de diferentes especies. En aspectos preferidos, un anticuerpo anti-ActRIIA de la presente descripción es un anticuerpo antagonista que puede inhibir la actividad de ActRIIA. Por ejemplo, un anticuerpo anti-ActRIIA de la presente descripción puede inhibir la unión de uno o más ligandos de ActRIIA seleccionados de entre activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, activina A, BMP6 y BMP7 al receptor ActRIIA y/o inhibir la activación por uno de estos ligandos de la transducción de señales de ActRIIA (p. ej., la transducción de señales de ActRIIA a través de SMAD2/3 y/o SMAD 1/5/8). En aspectos preferidos, los anticuerpos anti-ActRIIA de la presente descripción inhiben la unión de GDF11 al receptor ActRIIA y/o inhiben la activación por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA. Opcionalmente, los anticuerpos anti-ActRIIA de la descripción inhiben además la unión de GDF8 al receptor ActRIIA y/o inhiben la activación por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA. Opcionalmente, los anticuerpos anti-ActRIIA de la presente descripción no inhiben sustancialmente la unión de activina A al receptor ActRIIA y/o no inhiben sustancialmente la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-ActRIIA de la descripción que inhibe la unión de GDF11 y/o GDF8 a, y/o activación de, un receptor ActRIIA inhibe además la unión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, activina A, GDF8, BMP6 y BMP7 a, y/o activación de, el receptor ActRIIA.

Un anticuerpo anti-ActRIIB se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a ActRIIB con afinidad suficiente, de tal manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o agente terapéutico en el direccionamiento a ActRIIB. En ciertos aspectos, el grado de unión de un anticuerpo anti-ActRIIB a una proteína distinta de ActRIIB no relacionada es inferior a aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o inferior a 1 % de la unión del anticuerpo a ActRIIB como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-ActRIIB se une a un epítipo de ActRIIB que se conserva entre ActRIIB de diferentes especies. En aspectos preferidos, un anticuerpo anti-ActRIIB de la presente descripción es un anticuerpo antagonista que puede inhibir la actividad de ActRIIB. Por ejemplo, un anticuerpo anti-ActRIIB de la presente descripción puede inhibir la unión de uno o más ligandos de ActRIIB seleccionados de entre activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF11, GDF8, activina A, BMP6 y BMP7 al receptor ActRIIB y/o inhibir la activación por uno de estos ligandos de la transducción de señales de ActRIIB (p. ej., la transducción de señales de ActRIIB a través de SMAD2/3 y/o SMAD 1/5/8). En aspectos preferidos, los anticuerpos anti-ActRIIB de la presente descripción inhiben la unión de GDF11 al receptor ActRIIB y/o inhiben la activación por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIB. Opcionalmente, los anticuerpos anti-ActRIIB de la descripción inhiben además la unión de GDF8 al receptor ActRIIB y/o inhiben la activación por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIB. Opcionalmente, los anticuerpos anti-ActRIIB de la presente descripción no inhiben sustancialmente la unión de activina A al receptor ActRIIB y/o no inhiben sustancialmente la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIB. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-ActRIIB de la descripción que inhibe la unión de GDF11 y/o GDF8 a, y/o activación de, un receptor ActRIIB inhibe además la unión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, activina A, GDF8, BMP6 y BMP7 a, y/o activación de, el receptor ActRIIB.

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, GDF8, BMP6, BMP7, ActRIIB y ActRIIA humanos son muy conocidas en la técnica y, por tanto, los antagonistas de anticuerpos para uso según esta descripción pueden ser fabricados rutinariamente por el experto en la materia en base a los conocimientos de la técnica y las enseñanzas proporcionadas en esta solicitud.

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) es un anticuerpo quimérico. El término anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 4 816 567 y Morrison y col., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855. En algunos aspectos, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En algunos aspectos, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con "cambio de clase" en el que la clase o subclase ha sido cambiada con respecto a la del anticuerpo precursor. En general, los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En ciertos aspectos, un anticuerpo quimérico proporcionado en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de regiones hipervariables (HVR) no humanas y residuos de aminoácido de regiones de estructura (FR) humanas. En ciertos



aspectos, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (p. ej., 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, p. ej., un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

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 además, por ejemplo, en Riechmann y col., (1988) *Nature* 332:323-329; Queen y col. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; las patentes de los EE. UU. n.º 5 821 337, 7 527 791, 6 982 321 y 7 087 409; Kashmiri y col., (2005) *Methods* 36:25-34 [que describen el injerto de SDR (a-CDR)]; Padlan, *Mol. Immunol.* (1991) 28:489-498 (que describen la "remodelación de la superficie"); Dall'Acqua y col. (2005) *Methods* 36:43-60 (que describen la "transposición de FR"); Osbourn y col. (2005) *Methods* 36:61-68 y Klimka y col. *Br. J. Cancer* (2000) 83:252-260 (que describen la estrategia de "selección guiada" para transposición de FR).

Las regiones de estructura humanas que se pueden usar para humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones de estructura seleccionadas usando el procedimiento de "ajuste óptimo" [véase, p. ej., Sims y col. (1993) *J. Immunol.* 151:2296]; regiones de estructura derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o cadena pesada [véase, p. ej., Carter y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 y Presta y col. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623]; regiones de estructura (mutadas somáticamente) maduras humanas o regiones de estructura de la estirpe germinal humana [véase, p. ej., Almagro y Fransson (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633]; y regiones de estructura derivadas del cribado de colecciones de FR [véase, p. ej., Baca y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 y Rosok y col., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618].

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 y Lonberg (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459.

Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando un inmunógeno (p. ej., un polipéptido de GDF11, un polipéptido de GDF8, un polipéptido de ActRIIA o un polipéptido de ActRIIB) a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica. Tales animales contienen típicamente todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que sustituyen a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes extracromosómicamente o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales animales transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena generalmente han sido generalmente. Para consultar un análisis de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase, p. ej., Lonberg (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1117-1125; las patentes de los EE. UU. n.º 6 075 181 y 6 150 584 (que describen la tecnología XENOMOUSE™); la patente de los EE. UU. n.º 5 770 429 (que describe la tecnología HuMab®); la patente de los EE. UU. n.º 7 041 870 (que describe la tecnología K-M MOUSE®) y la solicitud de patente de los EE. UU. con n.º de publicación 2007/0061900 (que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, combinando con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos proporcionados en esta solicitud también se pueden fabricar mediante procedimientos a base de hibridomas. Se han descrito estirpes de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [véase, p. ej., Kozbor *J. Immunol.*, (1984) 133: 3001; Brodeur y col. (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York y Boerner y col. (1991) *J. Immunol.*, 147: 86]. También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridomas de linfocitos B humanos en Li y col., (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 7 189 826 (que describe la producción de anticuerpos de IgM humana monoclonales a partir de estirpes celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26(4):265-268 (2006) (que describen hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridomas humanos (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):185-91.

Los anticuerpos humanos proporcionados en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) también se pueden generar aislando secuencias de dominio variable de clones de Fv seleccionadas de entre colecciones de presentación en fagos derivadas de humanos. Tales secuencias de dominio variable se pueden combinar a continuación con un dominio constante humano deseado. En esta solicitud se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos.

Por ejemplo, se pueden aislar anticuerpos de la presente descripción cribando colecciones combinatorias para



seleccionar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Se conocen en la técnica un abanico de procedimientos para generar colecciones de presentación en fagos y cribar tales colecciones para seleccionar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Tales procedimientos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom y col. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien y col., Ed., Human Press, Totowa, NJ y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty y col. (1991) *Nature* 348:552-554; Clackson y col., (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks y col. (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks y Bradbury (2003) en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ.; Sidhu y col. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee y col. (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093; Fellouse (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 y Lee y col. (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132.

10

En ciertos procedimientos de presentación en fagos, se clonan independientemente repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que a continuación se pueden cribar para seleccionar fagos de unión a antígeno como se describe en Winter y col. (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455. Los fagos presentan típicamente fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de afinidad alta al inmunógeno (p. ej., GDF11, activina B, ActRIIA o ActRIIB) sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, se puede clonar el repertorio de fuentes no inmunizadas (p. ej., seres humanos) para proporcionar una única fuente de anticuerpos dirigidos contra un amplio abanico de autoantígenos y no autoantígenos sin ninguna inmunización, como describen Griffiths y col. (1993) *EMBO J.*, 12: 725-734. Por último, las colecciones de fuentes no inmunizadas también se pueden fabricar sintéticamente clonando segmentos de genes V no reordenados de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 muy variables y lograr el reordenamiento in vitro, como describen Hoogenboom y Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388. Las publicaciones de patentes que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de los EE. UU. n.º 5 750 373 y las patentes de los EE. UU. con n.º de publicación 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

25

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos (típicamente anticuerpos monoclonales) tienen especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco o seis o más) sobre uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) antígenos.

30

En ciertos aspectos, un anticuerpo multiespecífico de la presente descripción comprende dos o más especificidades de unión, siendo al menos una de las especificidades de unión por un epítomo de GDF11, y siendo opcionalmente una o más especificidades de unión adicionales por un epítomo sobre un ligando de ActRII diferente (p. ej., GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal) y/o un receptor ActRII (p. ej., un receptor ActRIIA y/o ActRIIB). En ciertos aspectos, los anticuerpos multiespecíficos se pueden unir a dos o más epítomos diferentes de GDF11. Preferiblemente, un anticuerpo multiespecífico de la descripción que tiene afinidad de unión, en parte, por un epítomo de GDF11 se puede usar para inhibir una actividad del GDF11 (p. ej., la capacidad para unirse a, y/o activar, un receptor ActRIIA y/o ActRIIB), y opcionalmente inhibir la actividad de uno o más ligandos de ActRII diferentes (p. ej., GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal) y/o un receptor ActRII (p. ej., un receptor ActRIIA o ActRIIB). En ciertos aspectos preferidos, los anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 se unen además a, y/o inhiben, al menos el GDF8. Opcionalmente, los anticuerpos multiespecíficos de la descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 no se unen sustancialmente a, y/o inhiben, la activina A. En algunos aspectos, los anticuerpos multiespecíficos de la descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF11 y GDD8 se unen además a, y/o inhiben, uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal.

40

En ciertos aspectos, un anticuerpo multiespecífico de la presente descripción comprende dos o más especificidades de unión, siendo al menos una de las especificidades de unión por un epítomo de GDF8, y siendo opcionalmente una o más especificidades de unión adicionales por un epítomo sobre un ligando de ActRII diferente (p. ej., GDF11, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal) y/o un receptor ActRII (p. ej., un receptor ActRIIA y/o ActRIIB). En ciertos aspectos, los anticuerpos multiespecíficos se pueden unir a dos o más epítomos diferentes de GDF8. Preferiblemente, un anticuerpo multiespecífico de la descripción que tiene afinidad de unión, en parte, por un epítomo de GDF8 se puede usar para inhibir una actividad del GDF8 (p. ej., la capacidad para unirse a, y/o activar, un receptor ActRIIA y/o ActRIIB), y opcionalmente inhibir la actividad de uno o más ligandos de ActRII diferentes (p. ej., GDF11, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal) y/o un receptor ActRII (p. ej., un receptor ActRIIA o ActRIIB). En ciertos aspectos preferidos, los anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF8 se unen además a, y/o inhiben, al menos el GDF11. Opcionalmente, los anticuerpos multiespecíficos de la descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF8 no se unen sustancialmente a, y/o inhiben, la activina A. En algunos aspectos, los anticuerpos multiespecíficos de la descripción que se unen a, y/o inhiben, el GDF8 y GDF11 se unen además a, y/o inhiben, uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y/o Nodal.

50

También se incluyen en esta solicitud anticuerpos genomanipulados con tres o más puntos de unión a antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos pulpo", (véase, p. ej., el documento US 2006/0025576A1).

65



En ciertos aspectos, los anticuerpos descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) son anticuerpos monoclonales. Anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o unen el mismo epítipo, a excepción de posibles variantes de anticuerpo, p. ej., que contienen mutaciones de origen natural o que se producen durante la producción de un preparado de anticuerpos monoclonales, estando presentes generalmente tales variantes en cantidades pequeñas. Al contrario que los preparados de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra epítopos diferentes, cada anticuerpo monoclonal de un preparado de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único epítipo sobre un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según los presentes procedimientos se pueden fabricar mediante un abanico de técnicas que incluyen, pero no se limitan a, el procedimiento del hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, tales procedimientos y otros procedimientos ejemplares para fabricar anticuerpos monoclonales se describen en esta solicitud.

Por ejemplo, usando inmunógenos derivados de GDF11 o GDF8, se pueden fabricar antiseros o anticuerpos monoclonales antiproteína/antipéptido mediante protocolos estándar [véase, p. ej., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) ed. por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Press]. Un mamífero, tal como un ratón, hámster o conejo, se puede inmunizar con una forma inmunogénica del polipéptido de GDF11 o GDF8, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o un péptido incluyen la conjugación a vehículos u otras técnicas muy conocidas en la técnica. Se puede administrar una porción inmunogénica de un polipéptido de GDF11 o GDF8 en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede supervisar mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Se pueden usar ELISA estándar u otros inmunoanálisis con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de producción de anticuerpos y/o el nivel de afinidad de unión.

Después de la inmunización de un animal con un preparado antigénico de GDF11 o GDF8, se pueden obtener antiseros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un animal inmunizado y fusionar mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizantes, tales como células de mieloma, para producir células de hibridoma. Tales técnicas son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma [véase, p. ej., Kohler y Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-497], la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos [véase, p. ej., Kozbar y col. (1983) *Immunology Today*, 4:72] y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole y col. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. páginas 77-96]. Las células de hibridoma se pueden cribar inmunoquímicamente para detectar la producción de anticuerpos reactivos específicamente con un polipéptido de GDF11 o GDF8 y aislar los anticuerpos monoclonales de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

En ciertos aspectos, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB), generando de ese modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (p. ej., una sustitución, eliminación y/o adición) en una o más posiciones de aminoácidos.

Por ejemplo, la presente descripción contempla una variante de anticuerpo que posee algunas funciones efectoras, pero no todas, que la convierten en una candidata deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante y para las que ciertas funciones efectoras [p. ej., la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)] son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (que probablemente, por tanto, carece de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar la ADCC, los linfocitos citolíticos naturales, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en, por ejemplo, Ravetch y Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de los EE. UU. n.º 5 500 362; Hellstrom, I. y col. (1986) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063; Hellstrom, I. y col. (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; la patente de los EE. UU. n.º 5 821 337 y Bruggemann, M. y col. (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361. Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (p. ej., ACTF™, ensayo de citotoxicidad no radioactivo para citometría de flujo; CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente,



o adicionalmente, la actividad ADCC del anticuerpo de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y col. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q y, por tanto, carece de actividad CDC [véanse, p. ej., ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402].

5 Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC [véase, p. ej., Gazzano-Santoro y col. (1996) J. Immunol. Methods 202:163; Cragg, MS y col. (2003) Blood 101:1045-1052 y Cragg, M. S y MJ Glennie (2004) Blood 103:2738-2743]. También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y depuración/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, p. ej., Petkova, S. B. y col. (2006) Int. Immunol. 18(12):1759-1769].

10

Los anticuerpos de la presente descripción (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) 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 los 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 aminoácido 15 265, 269, 270, 297 y 327, lo que incluye el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente de los EE. UU. n.º 7 332 581).

En ciertos aspectos, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, p. ej., "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo están sustituidos por residuos de cisteína. En aspectos particulares, los residuos 20 sustituidos se encuentran en puntos accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos por cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de ese modo en puntos accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de enlazador-fármaco, para crear un inmunoc conjugado, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud. En ciertos aspectos, uno cualquiera o más de los residuos siguientes se pueden sustituir por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de la UE) de la 25 cadena pesada y S400 (numeración de la UE) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 7 521 541.

Además, las técnicas usadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unir un antígeno en solución, 30 puede ser deseable ensayar la unión en solución. Se dispone de un abanico de técnicas diferentes para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión por resonancia de plasmones superficiales (p. ej., el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de tipo sándwich (p. ej., el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), inmunoelectrotransferencias, ensayos de inmunoprecipitación e 35 inmunohistoquímica.

En ciertos aspectos, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos y/o los polipéptidos de unión proporcionados en esta solicitud. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo y/o el polipéptido de unión. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un 40 anticuerpo y/o polipéptidos de unión se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo y/o polipéptido de unión o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo y/o el polipéptido de unión. Se puede realizar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características 45 deseadas, p. ej., unión a la diana (unión a GDF11, GDF8, ActRIIA y/o ActRIIB).

Se pueden hacer alteraciones (p. ej., sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Tales alteraciones se pueden hacer en "puntos críticos" de las HVR, es decir, en residuos codificados por codones que experimentan mutación a frecuencia alta durante el procedimiento de maduración somática (véase, p. ej., 50 Chowdhury (2008) Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)) y/o en las SDR (a-CDR), ensayando la variante de VH o VL resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad construyendo y reselectionado a partir de colecciones secundarias se ha descrito en la técnica, [véase, p. ej., Hoogenboom y col., en Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien y col., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)]. En algunos aspectos de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante 55 cualquiera de un abanico de procedimientos (p. ej., PCR propensa a error, transposición de cadena o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. La colección se criba a continuación para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a HVR, en las que se aleatorizan varios residuos de HVR (p. ej., 4-6 residuos a la vez). Los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno se pueden identificar específicamente, p. ej., usando modelado 60 o mutagénesis dirigida por barrido de alanina. En particular, a menudo se eligen como diana CDR-H3 y CDR-L3.

En ciertos aspectos, se pueden producir sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más HVR, siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden hacer alteraciones conservadoras (p. ej., sustituciones conservadoras como se proporcionan en esta solicitud) 65 en las HVR que no reducen sustancialmente la afinidad de unión. Tales alteraciones pueden estar fuera de los "puntos



críticos" de las HVR o SDR. En ciertos aspectos de las variantes de secuencias de VH y VL 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 de un anticuerpo y/o el polipéptido de unión que se pueden elegir como dianas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis dirigida por barrido de alanina", como describen Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (p. ej., residuos con carga como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo o polipéptido de unión con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las posiciones de aminoácido que presentan sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, se puede usar una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden elegir como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.
- 15 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino- y/o carboxiterminal que varían en cuanto a longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de un único o múltiples residuos de aminoácido. Los ejemplos de inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo aminoterminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión de los extremos amino- o carboxiterminal del anticuerpo a una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

- En ciertos aspectos, un anticuerpo y/o polipéptido de unión proporcionados en esta solicitud se pueden modificar adicionalmente para que contengan restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y fácilmente asequibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo y/o el polipéptido de unión incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, 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 polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo y/o al polipéptido de unión puede variar y, si hay fijado más de un polímero, estos pueden ser la misma molécula o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo y/o el polipéptido de unión que se va a mejorar, si el derivado de anticuerpo y/o el derivado de polipéptido de unión se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

- Cualquiera de los anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-activina A, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA y/o un anticuerpo anti-ActRIIB) se puede combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de ActRII descrito en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB) se puede usar en combinación con i) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII adicionales descritos en esta solicitud, ii) uno o más polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y/o ActRIIB), iii) una o más trampas de GDF descritas en esta solicitud; iv) uno o más antagonistas de ActRII de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); v) uno o más antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); vi) uno o más polipéptidos de folistatina descritos en esta solicitud; y/o vii) uno o más polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud.

#### **D. Antagonistas de molécula pequeña**

- 60 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula pequeña, o una combinación de moléculas pequeñas, que antagoniza la actividad de ActRII (p. ej., inhibición de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8). En particular, la descripción proporciona procedimientos para usar un antagonista de molécula pequeña o una combinación de antagonistas de molécula pequeña de ActRII, solo o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios [p. ej., factores de crecimiento hematopoyéticos (p. ej., G-CSF o GM-CSF),



transfusión de glóbulos rojos o sangre entera, terapia de quelación de hierro, tratamiento con hidroxiurea, etc.], para, p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, hemorragia falciforme proliferativa, hemorragia vítrea, priapismo) y/o reducir la carga de transfusión de sangre en un sujeto que lo necesita.

En algunos aspectos, un antagonista de ActRII preferido de la presente descripción es un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, que inhibe directa o indirectamente al menos la actividad del GDF11. Opcionalmente, tal antagonista de molécula pequeña, o combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir además, directa o indirectamente, el GDF8. Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción no inhibe sustancialmente la actividad de la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción que inhibe, directa o indirectamente, la actividad del GDF11 y/o GDF8 inhibe además, directa o indirectamente, la actividad de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB.

En ciertos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción es un inhibidor indirecto de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, Nodal, ActRIIA y ActRIIB. Por ejemplo, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción puede inhibir la expresión (p. ej., la transcripción, traducción, secreción celular o combinaciones de las mismas) de al menos el GDF11. Opcionalmente, tal antagonista de molécula pequeña, o combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir además la expresión de GDF8. Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción no inhibe sustancialmente la expresión de activina A. En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción que inhibe la expresión de GDF11 y/o GDF8 puede inhibir además la expresión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB.

En otros aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción es un inhibidor directo de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB. Por ejemplo, un antagonista de molécula pequeña preferido, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción se une directamente a, e inhibe la actividad de, al menos el GDF11 (p. ej., inhibe la capacidad del GDF11 para unirse a un receptor ActRIIA y/o ActRIIB; inhibe la activación mediada por GDF11 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción se puede unir además a, e inhibir la actividad de, el GDF8 (p. ej., inhibe la capacidad del GDF8 para unirse a un receptor ActRIIA y/o ActRIIB; inhibe la activación mediada por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción no se une sustancialmente a, ni inhibe, la actividad de la activina A (p. ej., la capacidad de la activina A para unirse a un receptor ActRIIA y/o ActRIIB; la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la vía de transducción de señales a través de SMAD 2/3). En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción que se une a, e inhibe la actividad de, el GDF11 y/o GDF8 se une además a, e inhibe la actividad de, uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB.

En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción se une directamente a, e inhibe la actividad de, al menos el GDF8 (p. ej., inhibe la capacidad del GDF8 para unirse a un receptor ActRIIA y/o ActRIIB; inhibe la activación mediada por GDF8 de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción puede unirse a, e inhibir la actividad de, el GDF11 (p. ej., inhibir la capacidad del GDF11 para unirse a un receptor ActRIIA y/o ActRIIB; inhibir la activación mediada por GDF11 de la transducción de señalización ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción no se une sustancialmente a, o inhibe la actividad de, la activina A (p. ej., la capacidad de la activina A para unirse a un receptor ActRIIA y/o ActRIIB; la activación mediada por activina A de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o combinaciones de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción que se une a, e inhibe la actividad de, el GDF8 y/o GDF11 se



une además a, e inhibe la actividad de, uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB.

En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción se une directamente a, e inhibe, la actividad de, al menos ActRIIA (p. ej., la activación mediada por ligando de ActRII de la transducción de señales de ActRIIA, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Por ejemplo, un antagonista de molécula pequeña preferido, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción se une a un receptor ActRIIA e inhibe al menos la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIA por el GDF11. Opcionalmente, tal antagonista de molécula pequeña, o combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir además la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIA por el GDF8. Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción no inhibe sustancialmente la unión a, y/o activación de, un receptor ActRIIA por la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción que inhibe la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIA por el GDF11 y/o GDF8, inhibe además la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIA por uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal.

En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la presente descripción se une directamente a, e inhibe la actividad de, al menos ActRIIB (p. ej., la activación mediada por ligando de ActRII de la transducción de señales de ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3). Por ejemplo, un antagonista de molécula pequeña preferido, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción se une a un receptor ActRIIB e inhibe la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIB por al menos el GDF11. Opcionalmente, tal antagonista de molécula pequeña, o combinación de antagonistas de molécula pequeña, puede inhibir además la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIB por el GDF8. Opcionalmente, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción no inhibe sustancialmente la unión a, y/o activación de, un receptor ActRIIB por la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de molécula pequeña, o una combinación de antagonistas de molécula pequeña, de la descripción que inhibe la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIB por el GDF11 y/o GDF8 inhibe además la unión a, y/o activación de, el receptor ActRIIB por uno o más de A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7 y Nodal.

Los antagonistas de molécula pequeña orgánica de unión de la presente descripción se pueden identificar y sintetizar químicamente usando metodología conocida (véanse, p. ej., las publicaciones PCT n.º WO 00/00823 y WO 00/39585). En general, los antagonistas de molécula pequeña de la descripción son normalmente de tamaño inferior a aproximadamente 2000 daltons, alternativamente de tamaño inferior a aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons, donde tales moléculas pequeñas orgánicas son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido como se describe en esta solicitud (p. ej., GDF11, GDF8, ActRIIA y ActRIIB). Tales antagonistas de molécula pequeña se pueden identificar sin experimentación excesiva usando técnicas muy conocidas. A este respecto, cabe señalar que las técnicas para cribar colecciones de moléculas pequeñas orgánicas para seleccionar moléculas que son capaces de unirse a una diana polipeptídica son muy conocidas en la técnica (véanse, p. ej., las publicaciones de patentes internacionales n.º WO00/00823 y WO00/39585).

Las moléculas pequeñas orgánicas de unión de la presente descripción pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas sustituidas en N, 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 diazo y cloruros de ácido.

Cualquiera de los antagonistas de ActRII de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB) se pueden combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, un antagonista de ActRII de molécula pequeña descrito en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB) se puede usar en combinación con i) uno o más antagonistas de ActRII de molécula pequeña adicionales descritos en esta solicitud, ii) uno o más polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y/o ActRIIB), iii) una o más trampas de GDF descritas en esta solicitud; iv) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB); v) uno o más antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (por ejemplo, un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina



C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); vi) uno o más polipéptidos de follistatina descritos en esta solicitud; y/o vii) uno o más polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud.

### E. Polinucleótidos antagonistas

5

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un polinucleótido, o una combinación de polinucleótidos, que antagoniza la actividad de ActRII (p. ej., inhibición de la transducción de señales de ActRIIA y/o ActRIIB, tal como la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8). En particular, la descripción proporciona procedimientos para usar un antagonista de ActRII de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de ActRII de polinucleótidos, solo o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios [p. ej., factores de crecimiento hematopoyético (p. ej., G-CSF o GM-CSF), transfusión de glóbulos rojos o sangre entera, terapia de quelación de hierro, tratamiento con hidroxiurea, etc.], para, p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea y/o priapismo) y/o reducir la carga de transfusión de sangre en un sujeto que lo necesita.

En algunos aspectos, un antagonista de ActRII de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de ActRII de polinucleótidos, de la presente descripción se puede usar para inhibir la actividad y/o expresión de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB. En ciertos aspectos preferidos, un antagonista de ActRII de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de ActRII de polinucleótidos, de la descripción es un antagonista de GDF-ActRII.

En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción inhibe la actividad y/o expresión (p. ej., la transcripción, traducción, secreción o combinaciones de las mismas) de al menos el GDF11. Opcionalmente, tal antagonista de polinucleótidos, o combinación de antagonistas de polinucleótidos, puede inhibir adicionalmente la actividad y/o expresión del GDF8. Opcionalmente, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción no inhibe sustancialmente la actividad y/o expresión de la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción que inhibe la actividad y/o expresión del GDF11 y/o GDF8 puede inhibir además la actividad y/o expresión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB.

En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción inhibe la actividad y/o expresión (p. ej., la transcripción, traducción, secreción o combinaciones de las mismas) de al menos el GDF8. Opcionalmente, tal antagonista de polinucleótidos, o combinación de antagonistas de polinucleótidos, puede inhibir además la actividad y/o expresión del GDF11. Opcionalmente, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción no inhibe sustancialmente la actividad y/o expresión de la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción que inhibe la actividad y/o expresión del GDF8 y/o GDF11 puede inhibir además la actividad y/o expresión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB.

En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción inhibe la actividad y/o expresión (p. ej., la transcripción, traducción, secreción o combinaciones de las mismas) de al menos ActRIIA. Opcionalmente, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción no inhibe sustancialmente la actividad y/o expresión de la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción que inhibe la actividad y/o expresión de ActRIIA puede inhibir además la actividad y/o expresión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal y/o ActRIIB.

En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción inhibe la actividad y/o expresión (p. ej., la transcripción, traducción, secreción o combinaciones de las mismas) de al menos ActRIIB. Opcionalmente, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción no inhibe sustancialmente la actividad y/o expresión de la activina A. En algunos aspectos, un antagonista de polinucleótidos, o una combinación de antagonistas de polinucleótidos, de la descripción que inhibe la actividad y/o expresión de ActRII puede inhibir además la actividad y/o expresión de uno o más de activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal y/o ActRIIA.

65



Los antagonistas de polinucleótidos de la presente descripción pueden ser un ácido nucleico no codificante, una molécula de ARNi [por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (siRNA), ARN de horquilla corta (shRNA), microARN (miARN)], un aptámero y/o una ribozima. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB humanos se conocen en la técnica y, por tanto, los antagonistas de polinucleótidos para uso según los procedimientos de la presente descripción pueden ser fabricados rutinariamente por un experto en la materia en base a los conocimientos de la técnica y las enseñanzas proporcionadas en esta solicitud.

Por ejemplo, se puede usar tecnología no codificante para controlar la expresión genética mediante ADN o ARN no codificante o mediante la formación de triple hélice. Las técnicas no codificantes se describen, 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 triple hélice se describe en, por ejemplo, Cooney y col. (1988) *Science* 241:456; y Dervan y col., (1991) *Science* 251:1300. Los procedimientos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN complementario. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos no codificantes comprenden una secuencia de ADN o ARN monocatenarios que es complementaria a al menos una porción de una transcripción de ARN de un gen descrito en esta solicitud (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB). Sin embargo, no se requiere complementariedad absoluta, aunque se prefiere.

Una secuencia "complementaria a al menos una porción de un ARN" a la que se hace referencia en esta solicitud significa una secuencia que tiene complementariedad suficiente para ser capaz de hibridarse con el ARN, lo que forma un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos no codificantes bicatenarios de un gen descrito en esta solicitud (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB) se puede ensayar, por tanto, una única cadena del dúplex de ADN o se puede ensayar la formación de tríplex. La capacidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico no codificante. Generalmente, cuanto mayor es el ácido nucleico de hibridación, más apareamientos incorrectos de bases con un ARN puede contener y seguir formando un dúplex estable (o tríplex, según sea el caso). Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de apareamientos incorrectos mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los polinucleótidos que son complementarios al extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia 5' no traducida hasta, e incluyendo, el codón de iniciación AUG, deberían funcionar con más efectividad para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha demostrado que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de ARNm también son efectivas para inhibir la traducción de ARNm [véase, por ejemplo, Wagner, R., (1994) *Nature* 372:333-335]. Por tanto, los oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes 5' o 3' no traducidas de un gen de la descripción (p. ej., GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB) se podrían usar en una estrategia no codificante para inhibir la traducción de un ARNm endógeno. Los polinucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deben incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los polinucleótidos no codificantes complementarios a regiones codificantes de ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción, pero se podrían usar según los procedimientos de la presente descripción. Independientemente de si están diseñados para hibridarse a las regiones 5' no traducida, 3' no traducida o codificante de un ARNm de la descripción (p. ej., un ARNm de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB), los ácidos nucleicos no codificantes deben tener al menos seis nucleótidos de longitud, y son preferiblemente oligonucleótidos que varían de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos, el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

En un aspecto, el ácido nucleico no codificante de la presente descripción (p. ej., un ácido nucleico no codificante de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA o ActRIIB) es producido intracelularmente mediante transcripción de una secuencia exógena. Por ejemplo, se transcribe un vector o una porción del mismo, lo que produce un ácido nucleico no codificante (ARN) de un gen de la descripción. Tal vector contendría una secuencia que codifica el ácido nucleico no codificante deseado. Tal vector puede permanecer episómico o integrarse cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN no codificante deseado. Tales vectores se pueden construir mediante procedimientos de tecnología de ADN recombinante estándar de la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y expresión en células de vertebrados. La expresión de la secuencia que codifica genes deseados de la presente descripción, o fragmentos de los mismos, se puede realizarse mediante cualquier promotor que se sabe en la técnica que actúa en células de vertebrados, preferiblemente de seres humanos. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a, la región de promotor temprano de SV40 [véase, p. ej., Benoist y Chambon (1981) *Nature* 29:304-310], el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous [véase, p. ej., Yamamoto y col. (1980) *Cell* 22:787-797], el promotor de timidina del herpes [véase, p. ej., Wagner y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445] y las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína [véase, p. ej., Brinster y col. (1982) *Nature* 296:39-42].

En algunos aspectos, los antagonistas de polinucleótidos son moléculas de ARN o ARNi que se dirigen a la expresión de uno o más de: GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB.



ARNi se refiere a la expresión de un ARN que interfiere con la expresión del ARNm objetivo. Específicamente, el ARNi silencia un gen objetivo al interactuar con el ARNm específico mediante un siRNA (ARN de interferencia pequeño). El complejo de ARN bicatenario se convierte a continuación en objetivo para la degradación por la célula. Una molécula de siRNA es un dúplex de ARN bicatenario de 10 a 50 nucleótidos de longitud, que interfiere con la expresión de un gen objetivo que es lo suficientemente complementario (p. ej., al menos 80 % de identidad con el gen). En algunos aspectos, la molécula de siRNA comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen objetivo.

Las moléculas de ARNi adicionales incluyen ARN de horquilla corta (shRNA); así como horquilla de interferencia corta y microARN (miARN). La molécula de shRNA contiene secuencias codificantes y no codificantes de un gen objetivo conectadas por un bucle. El shRNA es transportado del núcleo al citoplasma y es degradado junto con el ARNm. Los promotores Pol III o U6 se pueden usar para expresar ARN para ARNi. Paddison y col. [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002] han usado moléculas de ARN pequeñas plegadas en horquillas como un medio para lograr ARNi. Por consiguiente, tales moléculas de ARN de horquilla corta (shRNA) también se usan ventajosamente en los procedimientos descritos en esta solicitud. La longitud del tallo y el bucle de los shRNA funcionales varía; las longitudes de los tallos pueden variar de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 nt y el tamaño del bucle puede variar de 4 a aproximadamente 25 nt sin que esto afecte a la actividad de silenciamiento. Sin desear ceñirnos a ninguna teoría particular, se cree que estos shRNA se asemejan a los productos de ARN bicatenario (dsARN) de la RNasa DICER y, en cualquier caso, tienen la misma capacidad para inhibir la expresión de un gen específico. El shRNA se puede expresar 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" y que posteriormente se procesa para producir miARN maduro después del procesamiento adicional mediante el RISC.

Las moléculas que median ARNi, lo que incluye, sin limitación, siRNA, se pueden producir *in vitro* mediante síntesis química (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), hidrólisis de dsARN (Yang y col., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), mediante transcripción *in vitro* con T7 ARN polimerasa (Donzeet y col., Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu y col., Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002) y mediante hidrólisis de ARN bicatenario utilizando una nucleasa tal como RNasa III de *E. coli* (Yang y col., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002).

Según otro aspecto, la descripción proporciona antagonistas de polinucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, un ADN señuelo, un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, un ADN complejo, un ADN encapsulado, un ADN vírico, un ADN de plásmido, un ARN desnudo, un ARN encapsulado, un ARN vírico, un ARN bicatenario, una molécula capaz de generar interferencia de ARN o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, los antagonistas de polinucleótidos de la descripción son aptámeros. Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico, que incluyen moléculas de ADN bicatenario y ARN monocatenario, que se unen y forman estructuras terciarias que se unen específicamente a una molécula diana, tal como un polipéptido de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y ActRIIB. La generación y el uso terapéutico de aptámeros están muy consolidados en la técnica. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5 475 096. Se puede encontrar información adicional sobre aptámeros en la solicitud de patente de los EE. UU. con n.º de publicación 20060148748. Los aptámeros de ácidos nucleicos se seleccionan usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el procedimiento de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX). SELEX es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión muy específica a moléculas diana como se describe en, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 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 los EE. UU. n.º 5 270 163. El procedimiento SELEX se basa en la capacidad de los ácidos nucleicos para formar un abanico de estructuras bi- y tridimensionales, así como en la versatilidad química disponible en los monómeros de nucleótido para actuar como ligandos (formar pares de unión específica) con virtualmente cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico, lo que incluye otras moléculas de ácido nucleico y polipéptidos. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como dianas. El procedimiento SELEX implica la selección de una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones graduales de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para conseguir la afinidad y selectividad de unión deseadas. A partir de una mezcla de ácidos nucleicos, que puede comprender un segmento de secuencia aleatorizada, el procedimiento SELEX incluye 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 ácido nucleico-diana; amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando. Las etapas de unión, separación, disociación y amplificación se repiten tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido nucleico de afinidad muy específica por la molécula diana.

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



Cualquiera de los antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB) se pueden combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, un antagonista de ActRII de polinucleótidos descrito en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB) se puede usar en combinación con i) uno o más antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud, ii) uno o más polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y/o ActRIIB), iii) una o más trampas de GDF descritas en esta solicitud; iv) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB); v) uno o más antagonistas de ActRII de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); vi) uno o más polipéptidos de folistatina descritos en esta solicitud; y/o vii) uno o más polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud.

## 20 F. Otros antagonistas

En otros aspectos, un agente para uso según los procedimientos descritos en esta solicitud es un polipéptido de folistatina, que se puede usar solo o en combinación con uno o más agentes estimulantes de la eritropoyesis (p. ej., EPO) u otros tratamientos complementarios [p. ej., factores de crecimiento hematopoyéticos (p. ej., G-CSF o GM-CSF), transfusión de glóbulos rojos o sangre entera, terapia de quelación de hierro, tratamiento con hidroxiurea, etc.] para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, y procedimientos para tratar una drepanocitosis en un sujeto que lo necesita, y/o procedimientos para tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis) y/o reducir la carga de transfusión de sangre. El término "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de folistatina de origen natural, así como cualquier variante de los mismos (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conserva una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcionales de folistatina. En ciertos aspectos preferidos, los polipéptidos de folistatina de la descripción se unen a, y/o inhiben la actividad de, la activina, particularmente la activina A (p. ej., la activación mediada por activina de la transducción de señales a través de SMAD 2/3 de ActRIIA y/o ActRIIB). Las variantes de polipéptidos de folistatina que conservan las propiedades de unión a activina se pueden identificar en base a estudios anteriores que implican interacciones entre folistatina y activina. Por ejemplo, el documento WO2008/030367 describe dominios de folistatina específicos ("FSD") que se ha demostrado que son importantes para la unión a activina. Como se muestra más adelante en las SEQ ID NO: 18-20, el dominio aminoterminal de la folistatina ("FSND" SEQ ID NO: 18), FSD2 (SEQ ID NO: 20) y, en menor medida, FSD1 (SEQ ID NO: 19) representan dominios ejemplares de la folistatina que son importantes para la unión a activina. Además, los procedimientos para fabricar y ensayar colecciones de polipéptidos se describieron anteriormente en el contexto de los polipéptidos de ActRII, y tales procedimientos también se refieren a la fabricación y el ensayo de variantes de folistatina. Los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tiene una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina, y opcionalmente al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o identidad superior. Los ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de la folistatina humana (SEQ ID NO: 16) como se describe, por ejemplo, en el documento WO2005/025601.

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

1 mvrarhqp<sup>gg</sup> lcllllllllcq fmedrsaqag ncwlrqakng rcqvlyktel  
 51skeeccstgr lstswteedv ndntlfkwmi fnggapncip cketcenvdc  
 101gpggkkrmnk knkprcvcap dcsnitwkgp vcgldgktyr necallkarc  
 151keqpelevqy qgrckktcrd vfcpgsstcv vdgtnnaycv tcnricpepa  
 201sseqylcgnd gvtysachl rkatcllgrs iglayegkci kakscediqc  
 251tggkklwdf kvgrgrcslc delcpdsksd epvcasdnat yasecamkea  
 301 acssgvll<sup>ev</sup> khsgscnsis edteeeeeede dqdysfpiss ilew  
 (SEQ ID NO: 16; NCBI Reference No. NP\_037541.1)

El péptido señal está subrayado; también están subrayados los últimos 27 residuos que representan la extensión



carboxiterminal que distingue esta isoforma de la folistatina de la isoforma de la folistatina más corta FST317 mostrada a continuación.

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

5 1MVRARHQPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL  
 51SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC  
 101GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWGP VCGLDGKTYR NECALLKARC  
 151KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNAYCV TCNRICPEPA  
 201SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC  
 251TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA  
 301ACSSGVLEEV KHSGSCN

(SEQ ID NO: 17; NCBI Número de referencia NP\_006341.1)

El péptido señal está subrayado.

10 La secuencia del dominio aminoterminal de la folistatina (FSND) es la siguiente:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI  
 IFNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 18; FSND)

15 Las secuencias FSD1 y FSD2 son las siguientes:

ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 19; FSD1)  
 KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVT (SEQ ID NO: 20; FSD2)

20 En otros aspectos, un agente para uso según los procedimientos descritos en esta solicitud (p. ej., procedimientos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, procedimientos para tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita y procedimientos para tratar o impedir un trastorno/afección de la drepanocitosis) es un gen relacionado con la folistatina (FLRG), también conocido como proteína 3 relacionada con la folistatina (FSTL3). El término "polipéptido de FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de FLRG, así como cualquier variante de los mismos (lo que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conserva una actividad útil. En ciertos aspectos preferidos, los polipéptidos de FLRG de la descripción se unen a, y/o inhiben la actividad de, la activina, particularmente la activina A (p. ej., la activación mediada por activina de la transducción de señales a través de SMAD 2/3 de ActRIIA y/o ActRIIB). Las variantes de polipéptidos de FLRG que conservan las propiedades de unión a activina se pueden identificar usando procedimientos rutinarios para ensayar las interacciones entre FLRG y activina (véase, p. ej., el documento US 6 537 966). Además, los procedimientos para fabricar y ensayar colecciones de polipéptidos se describieron anteriormente en el contexto de los polipéptidos de ActRII, y tales procedimientos también se refieren a la fabricación y el ensayo de variantes de FLRG. Por ejemplo, los polipéptidos de FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocida que tiene una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de FLRG, y opcionalmente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o identidad superior.

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

1 MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMSGG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL  
 51VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD  
 101GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECELRA  
 151ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC  
 201PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP  
 251PGGESAEIEEE NFV

(SEQ ID NO:21; NCBI Número de referencia NP\_005851.1)



El péptido señal está subrayado.

- 5 En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y los polipéptidos de FLRG incluyen proteínas de fusión que tienen 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 facilitan el aislamiento, la detección, la estabilización o la multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se comentaron pormenorizadamente anteriormente con referencia a los polipéptidos de ActRII. En algún aspecto, un agente
- 10 antagonista de la descripción es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de folistatina fusionado a un dominio Fc. En otro aspecto, un agente antagonista de la descripción es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de FLRG fusionado a un dominio Fc.
- 15 Cualquiera de los polipéptidos de folistatina descritos en esta solicitud se puede combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, un polipéptido de ActRII descrito en esta solicitud se puede usar en combinación con i) uno o más polipéptidos de folistatina adicionales descritos en esta
- 20 solicitud, ii) uno o más polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y/o ActRIIB; iii) una o más trampas de GDF descritas en esta solicitud; iv) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB); v) uno o más antagonistas de ActRII
- 25 de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); vi) uno o más antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA, y/o ActRIIB); y uno o más polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud.
- 30 Similarmente, cualquiera de los polipéptidos de FLRG descritos en esta solicitud se puede combinar con uno o más agentes antagonistas de ActRII adicionales de la descripción para conseguir el efecto deseado (p. ej., aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en un sujeto que lo necesita, tratar o impedir una anemia, tratar la drepanocitosis, tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis). Por ejemplo, un polipéptido de FLRG
- 35 descrito en esta solicitud se puede usar en combinación con i) uno o más polipéptidos de FLRG adicionales descritos en esta solicitud, ii) uno o más polipéptidos de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., polipéptidos de ActRIIA y/o ActRIIB; iii) una o más trampas de GDF descritas en esta solicitud; iv) uno o más anticuerpos antagonistas de ActRII descritos en esta solicitud (p. ej., un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-activina B, un anticuerpo anti-activina C, un anticuerpo anti-activina E, un anticuerpo anti-GDF11, un anticuerpo anti-GDF8, un anticuerpo anti-BMP6, un anticuerpo anti-BMP7, un anticuerpo anti-ActRIIA o un anticuerpo anti-ActRIIB); v) uno o más antagonistas de ActRII
- 40 de molécula pequeña descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de molécula pequeña de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA y/o ActRIIB); vi) uno o más antagonistas de ActRII de polinucleótidos descritos en esta solicitud (p. ej., un antagonista de polinucleótidos de uno o más de GDF11, GDF8, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E, BMP6, BMP7, Nodal, ActRIIA, y/o ActRIIB); y uno o más polipéptidos de folistatina descritos en esta solicitud.
- 45

### 3. Ensayos de cribado

- En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere al uso de los polipéptidos de ActRII (p. ej., polipéptidos de
- 50 ActRIIA y ActRIIB) y polipéptidos de trampa de GDF objetivo para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de polipéptidos de ActRIIB. Los compuestos identificados mediante este cribado se pueden ensayar para evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos se pueden ensayar, por ejemplo, en modelos animales.
- 55 Hay numerosas estrategias para el cribado de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina dirigiéndose a la transducción de señales de ActRII (p. ej., la transducción de señales a través de SMAD 2/3 y/o SMAD 1/5/8 de ActRIIA y/o ActRIIB). En ciertos aspectos, el cribado de alto rendimiento de compuestos se puede llevar a cabo para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRII sobre una estirpe celular seleccionada. En ciertos aspectos, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben
- 60 específicamente o reducen la unión de un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRII (p. ej., activina A, activina B, activina AB, activina C, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRII. En un aspecto adicional, los compuestos se pueden identificar mediante su capacidad para interactuar con un polipéptido de ActRII o polipéptido
- 65 de trampa de GDF.



Bastará un abanico de formatos de ensayo y, a la vista de la presente descripción, aquellos no descritos expresamente en esta solicitud serán comprendidos, no obstante, por un experto en la materia. Como se describe en esta solicitud, los compuestos de ensayo (agentes) de la descripción se pueden crear mediante cualquier procedimiento químico  
 5 combinatorio. Alternativamente, los compuestos objetivo pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se van a ensayar para determinar su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (p. ej., productos naturales), producidos químicamente (p. ej., moléculas pequeñas, lo que incluye peptidomiméticos) o producidos recombinantemente. Los compuestos de ensayo contemplados por la presente  
 10 descripción incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, glúcidos, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En ciertos aspectos, el agente de ensayo es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 Daltons.

Los compuestos de ensayo de la descripción se pueden proporcionar como entidades únicas y discretas o como  
 15 colecciones de mayor complejidad, tal como fabricadas mediante química combinatorio. Estas colecciones pueden comprender, por ejemplo, glúcidos, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser de forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de cribado. Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar opcionalmente con otros compuestos y tienen grupos de derivatización que facilitan  
 20 el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticulantes fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos con colecciones de compuestos y extractos naturales de ensayo, son  
 25 deseables ensayos de alto rendimiento con el fin de maximizar el número de compuestos estudiados en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas exentos de células, tales como los que se pueden derivar con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como cribados "principales", ya que se pueden generar para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Asimismo, los efectos de la toxicidad celular o  
 30 biodisponibilidad del compuesto de ensayo generalmente se pueden ignorar en el sistema *in vitro*, centrando principalmente el ensayo en su lugar en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como se puede poner de manifiesto por una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido de ActRII o un polipéptido de trampa de GDF y su pareja de unión (p. ej., un ligando de ActRII).

35 Simplemente a modo ilustrativo, en un ensayo de cribado ejemplar de la presente descripción, 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 proceda para la intención del ensayo. La mezcla del compuesto y el polipéptido de ActRIIB se añade a continuación a una composición que contiene un ligando de ActRIIB (p. ej., GDF11). La detección y cuantificación de complejos de ActRIIB/ligando de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del  
 40 compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de dosis-respuesta a partir de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Asimismo, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar un valor de referencia para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido de ActRIIB y se cuantifica la  
 45 formación de complejo de ActRIIB/ligando de ActRIIB en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos se puede variar, y se pueden mezclar simultáneamente. Asimismo, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para conseguir un sistema de ensayo exento de células adecuado.

50 La formación de complejos entre un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF y su proteína de unión se puede detectar mediante un abanico de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tal como radiomarcadas (p. ej., <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>3</sup>H), marcadas fluorescentemente (p. ej., FITC), o usando polipéptido de ActRIIB o polipéptido de trampa de GDF marcado enzimáticamente y/o su proteína de unión, mediante inmunoanálisis o mediante detección cromatográfica.

55 En ciertos aspectos, la presente descripción contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (véase, p. ej., la publicación PCT WO  
 60 96/26432 y la patente de los EE. UU. n.º 5 677 196), resonancia de plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchos aspectos de la descripción.

Asimismo, la presente descripción contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido de  
 65 ActRII o polipéptido de trampa de GDF y su pareja de unión. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5 283 317;



Zervos y col. (1993) Cell 72:223-232; Madura y col. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel y col. (1993) Biotechniques 14:920-924 y lwabuchi y col. (1993) Oncogene 8:1693-1696). En un aspecto específico, la presente descripción contempla el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (p. ej., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido de ActRII o una trampa de GDF y su proteína de unión [véase, p. ej., Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81 y las patentes de los EE. UU. n.º 5 525 490; 5 955 280 y 5 965 368].

En ciertos aspectos, los compuestos objetivo se pueden identificar mediante su capacidad para interactuar con un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF. La interacción entre el compuesto y el polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción se puede identificar a nivel proteico usando procedimientos bioquímicos *in vitro*, que incluyen fotorreticulación, unión a ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad véase, p. ej., (Jakoby WB y col. (1974) Methods in Enzymology 46:1). En ciertos casos, los compuestos se pueden cribar en un ensayo a base de mecanismos, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido de ActRII o polipéptido de trampa de GDF se puede transfectar con un sistema indicador (p. ej.,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y se puede cribar contra la colección, preferiblemente mediante cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la colección. Se pueden usar ensayos de unión a base de otros mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, una perla o un chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta mediante electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar normalmente usando criterios de valoración colorimétricos, fluorescencia, o resonancia de plasmones superficiales.

#### 4. Usos terapéuticos ejemplares

En ciertos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para tratar o impedir una anemia en un sujeto que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede para tratar la drepanocitosis, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para tratar o impedir la anemia en un sujeto con drepanocitosis que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para tratar o impedir una o más complicaciones de la drepanocitosis (p. ej., anemia, crisis de anemia, esplenomegalia, crisis de dolor, síndrome torácico, síndrome torácico agudo, necesidad de transfusión de sangre, lesión de órganos, necesidad de (tratamiento con) analgésicos, crisis de secuestro esplénico, crisis hiperhemolítica, vasooclusión, crisis de vasooclusión, infarto agudo de miocardio, enfermedad pulmonar falciforme crónica, tromboembolismo, insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, sobrecarga de hierro, infarto esplénico, insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis, aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítreo y/o priapismo) en un sujeto que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para tratar o impedir crisis de vasooclusión en un sujeto con drepanocitosis que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para tratar o impedir crisis de dolor en un sujeto con drepanocitosis que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos. En algunos aspectos, un agente antagonista de ActRII, o una combinación de agentes antagonistas de ActRII, de la presente descripción se puede usar para tratar o impedir una crisis de anemia en un sujeto con drepanocitosis que lo necesita, particularmente en mamíferos tales como roedores, primates y seres humanos.

Como se emplea en esta solicitud, un agente terapéutico que "impide" un trastorno o una afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o la afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o la afección con respecto a la muestra de control no tratada.

El término "tratar", como se emplea en esta solicitud, incluye la mejora o eliminación de la afección una vez que se ha consolidado. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento se pueden discernir del diagnóstico proporcionado por un médico u otro profesional sanitario y del 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 descripción



se consigue administrando uno o más de los antagonistas de ActRII (p. ej., un antagonista de ActRIIA y/o ActRIIB) de la presente descripción en una cantidad efectiva. Una cantidad efectiva de un agente se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente de la presente descripción puede variar en función de factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y peso del individuo y la capacidad del agente para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado.

Numerosos genes contribuyen a la drepanocitosis clásica (SCD; drepanocitosis). Principalmente, la drepanocitosis es un trastorno hereditario provocado por una mutación en el gen de la  $\beta$ -globina (una mutación de un glutamato a una valina en el codón 6). Véase, p. ej., Kassim y col. (2013) *Annu Rev Med*, 64: 451-466. La drepanocitosis se refiere a la forma más común de drepanocitosis, con una mutación homocigótica en el alelo  $\beta^S$  (HbSS), que afecta de 60 a 70 % de las personas con drepanocitosis.

Debido a la mutación en el gen de la  $\beta$ -globina, se producen moléculas de hemoglobina anómalas con un motivo hidrófobo que queda expuesto cuando está en un estado desoxigenado [véase, p. ej., Eaton y col. (1990) *Adv Protein Chem*, 40: 63-279; Steinberg, MH (1999) *N Engl J Med* 340(13): 1021-1030 y Ballas y col. (1992) *Blood*, 79(8): 2154-63]. Una vez expuestas, las cadenas de las moléculas de hemoglobina individuales polimerizan, lo que da como resultado lesión en la membrana de los glóbulos rojos y deshidratación celular. La lesión de la membrana se pone de manifiesto, en parte, por una redistribución de los lípidos de la membrana que conduce a la expresión de fosfatidilserina en la cara exterior de la membrana de los eritrocitos [véase, p. ej., (2002) *Blood* 99 (5): 1564-1571]. La fosfatidilserina externalizada favorece la adhesión tanto a macrófagos como a células endoteliales activadas, lo que contribuye a la (vaso)oclusión vascular. Por tanto, en estados de oxígeno bajo, la hemoglobina del glóbulo rojo precipita en cristales largos que provocan que se alargue, cambiando morfológicamente a un glóbulo rojo "falciforme". Tanto el genotipo como la magnitud y el grado de desoxigenación contribuyen a la gravedad de la polimerización de hemoglobina. Se ha demostrado que la presencia de hemoglobina fetal reduce proporcionalmente la cantidad de polímeros de hemoglobina patológicos y protege de crisis vasooclusivas.

La mayoría de los pacientes con drepanocitosis padecen episodios dolorosos denominados crisis de dolor. Una crisis de dolor por drepanocitosis se refiere a dolor agudo relacionado con la falciformación que dura al menos 1 hora (p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 10 horas) y opcionalmente requiere terapia de tratamiento del dolor tal como, por ejemplo, administración de uno o más agentes narcóticos y/o antiinflamatorios no esteroideos. Una crisis de dolor típicamente da como resultado la admisión del paciente en un centro médico para recibir terapia de tratamiento del dolor. El dolor agudo en pacientes con drepanocitosis generalmente es de naturaleza isquémica y puede ser consecuencia de la oclusión de lechos microvasculares. Los datos clínicos indican que algunos pacientes con drepanocitosis tienen de tres a diez episodios de crisis de dolor al año. En muchos pacientes, un episodio de crisis de dolor se resolverá típicamente en aproximadamente una semana. En algunos casos, los episodios graves pueden persistir durante varias semanas o incluso meses. El tratamiento del dolor en la drepanocitosis a menudo requiere la administración de uno o más analgésicos opioides (p. ej., hidromorfona, meperidina, etc.), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, ketorolaco trometamina) y corticosteroides. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea) para tratar o impedir crisis de dolor en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (por ejemplo, un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para reducir la frecuencia de tratamiento del dolor (p. ej., tratamiento con uno o más narcóticos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y/o corticosteroides) en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para reducir la cantidad de dosis de uno o más agentes para el tratamiento del dolor (p. ej., narcóticos, antiinflamatorios no esteroideos y/o corticosteroides) en un paciente con drepanocitosis.

Los pacientes con SCD que reciben transfusiones frecuentes de glóbulos rojos o sangre entera son propensos a desarrollar sobrecarga de hierro transfusional, lo que puede explicar en parte por qué se asocia la dependencia de transfusiones en la SCD a una probabilidad reducida de supervivencia. No obstante, el uso de terapia de quelación de hierro en pacientes con SCD dependientes de transfusiones sigue siendo controvertido, porque los datos retrospectivos y de registro sugieren que los pacientes tratados con quelación de hierro pueden vivir más que los pacientes no tratados con quelación de hierro, aunque no hay datos de ensayos prospectivos aleatorizados que demuestren el beneficio en la morbilidad o mortalidad de la quelación y los agentes actualmente aprobados no son convenientes (deferroxamina) o son costosos y mal tolerados por muchos pacientes (deferasirox). Por consiguiente, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea) para reducir la frecuencia de las transfusiones de sangre o reducir la dosis de la terapia de quelación en pacientes con SCD.



En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales, para reducir el contenido de hierro en el hígado y/o impedir o revertir una complicación hepática de la sobrecarga de hierro, lo que incluye, p. ej.,

5 agrandamiento del hígado (hepatomegalia), fibrosis hepática (aumento de tejido cicatricial) y cirrosis (cicatrización amplia). En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (*por ejemplo*, un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales para impedir o revertir una complicación endocrina de la sobrecarga de hierro, lo que incluye, *por ejemplo*, diabetes sacarina.

10

Las crisis vasooclusivas son una de las características clínicas distintivas de la drepanocitosis. Véase, p. ej., Rees y col. (2010) Lancet, 376: 2018-2031. La hipoxia, la acidosis, el estrés inflamatorio y la activación de las células endoteliales favorecen la compresión de eritrocitos y leucocitos falciformes polimerizados y rígidos en los vasos pequeños. Los glóbulos rojos falciformes obstruyen los capilares y restringen el flujo sanguíneo al órgano, lo que

15 conduce a isquemia, dolor, necrosis tisular y lesión a diversos órganos. Esto puede provocar obstrucción vascular, lo que conduce a isquemia tisular. Aunque la polimerización y la lesión incipiente a la membrana son inicialmente reversibles, los episodios de falciformación repetidos conducen a eritrocitos irreversiblemente falciformes, que pueden afectar a un abanico de sistemas orgánicos y conducir a la muerte. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o

20 tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir crisis vasooclusivas en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir la vasooclusión en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o

25 tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación de la vasooclusión en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir el dolor por vasooclusión en un paciente con

30 drepanocitosis.

Al igual que las complicaciones vasooclusivas, la anemia hemolítica conduce a morbilidad significativa en pacientes con drepanocitosis. Véase, p. ej., Pakbaz y col. (2014) Hematol Oncol Clin N Am 28: 355-374; Kassim y col. (2013) Annu Rev Med 64: 451-466. Múltiples factores contribuyen a la anemia crónica en la drepanocitosis. A medida que los

35 eritrocitos se deforman, se crean anticuerpos contra los antígenos expuestos, lo que conduce a destrucción de eritrocitos aumentada, con una vida promedio de 17 días en lugar de 110 a 120 días. La liberación de hemoglobina durante la hemólisis inhibe la transducción de señales del óxido nítrico, lo que conduce a disfunción de las células endoteliales y contribuye a un estado de hipercoagulabilidad. La hemólisis crónica contribuye a la anemia, junto con un mecanismo compensador de eritrocitos defectuoso provocado por carencias de hormonas y vitaminas. La

40 nefropatía progresiva es común en la drepanocitosis, lo que conduce a eritropoyetina reducida y, por tanto, estimulación defectuosa de la eritropoyesis. La carencia de folato y hierro es común debido a la demanda superior de producción de eritrocitos y a las pérdidas urinarias de hierro aumentadas. Todos estos factores contribuyen a la anemia crónica en pacientes con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios,

45 para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir la anemia en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (por ejemplo, un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una complicación de la anemia en un paciente con drepanocitosis.

50

La anemia aguda, que puede ser grave y potencialmente mortal, se asocia a una tasa de mortalidad de 10 % a 15 % en pacientes con drepanocitosis. En general, los episodios graves se precipitan por tres causas principales: crisis de secuestro esplénico, crisis aplásicas o crisis hiperhemolíticas [véase, p. ej., Ballas y col. (2010) Am J Hematol, 85: 6-13].

55

Las crisis de secuestro esplénico se producen como resultado de la vasooclusión de eritrocitos en el bazo, donde un agrupamiento de eritrocitos provoca su rápido agrandamiento. Como tal, hay una reducción de la hemoglobina circulante (p. ej., una disminución de 2 g/dL) y del volumen circulante efectivo, lo que puede conducir a shock hipovolémico. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción,

60 opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir crisis de secuestro esplénico en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir el secuestro esplénico de glóbulos rojos en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes

65 antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un



polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), combinados opcionalmente con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea) para tratar o impedir la esplenomegalia en un paciente con drepanocitosis.

- 5 Las crisis aplásicas se producen cuando la eritropoyesis es defectuosa. Debido a la sobreproducción constante de eritrocitos, una crisis aplásica puede dar como resultado rápidamente anemia grave. Las infecciones, tales como por parvovirus B19, estreptococos, salmonela y virus de Epstein-Barr, son causas comunes de la detención transitoria de la eritropoyesis. Tanto los eritrocitos circulantes como los reticulocitos se reducen durante las crisis aplásicas. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en  
10 combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir crisis aplásicas en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea) para tratar o impedir la anemia aplásica en un  
15 paciente con drepanocitosis.

- La hiperhemólisis se produce cuando hay una exacerbación repentina de la anemia con reticulocitosis, sin signos de secuestro esplénico. Se han documentado crisis hiperhemolíticas en pacientes con múltiples transfusiones o en pacientes que reciben terapia con inmunoglobulina intravenosa. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más  
20 agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir crisis hiperhemolíticas en un paciente con drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir la anemia hiperhemolítica en un paciente con drepanocitosis.

- 25 En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación cardíaca de la drepanocitosis. Típicamente, la anemia crónica en la drepanocitosis provoca un gasto cardíaco aumentado compensatorio. Esto, a su vez, conduce a cardiomegalia e hipertrofia ventricular izquierda con disfunción ventricular izquierda. Véase, p. ej., Adebayo y col. (2002) Niger J Med, 11: 145-152; Sachdev y col. (2007) J Am Coll Cardiol, 49: 472-279 y Zilberman y col. (2007) Am J Hematol 82: 433-438. Se puede producir infarto agudo de miocardio, incluso sin coronariopatía y, por tanto, está infradiagnosticado en la drepanocitosis [véase, p. ej., Pannu y col. (2008) Crit Pathw Cardio, 7: 133-138]. Las arritmias cardíacas y la insuficiencia cardíaca congestiva también se han relacionado con la muerte prematura en pacientes con drepanocitosis [véase, p. ej., Fitzhugh y col. (2010) Am J  
30 Hematol 85: 36-40]. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más complicaciones cardíacas de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., gasto cardíaco aumentado, cardiomegalia, cardiomiopatía, hipertrofia ventricular izquierda, infarto  
35 agudo de miocardio, arritmia e insuficiencia cardíaca congestiva.  
40

- En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación pulmonar de la drepanocitosis. La drepanocitosis a menudo da como resultado complicaciones  
45 pulmonares tanto agudas como crónicas [véase, p. ej., Rucknagel, DL (2001) Pediatr Pathol MOI Med, 20: 137-154; Haynes y col. (1986) Am J Med 80: 833-840]. Las complicaciones agudas pueden incluir infección, embolia pulmonar por trombos, infarto de médula ósea y embolia grasa. Se puede producir disfunción pulmonar debido al dolor local de los infartos costales y esternales, lo que conduce a hipoventilación y atelectasia con hipoxemia. Las complicaciones crónicas incluyen enfermedad pulmonar falciforme crónica e hipertensión pulmonar. El síndrome torácico agudo (ACS)  
50 es exclusivo de personas con drepanocitosis y se define por un infiltrado pulmonar nuevo que implica al menos un segmento pulmonar completo, dolor torácico y temperatura superior a 38,5 °C, junto con taquipnea, sibilancia o tos [véase, p. ej., Vichinsky y col. (2000) N Engl J Med, 342: 1855-1865]. El desarrollo de infarto pulmonar, embolia grasa e infecciones pueden contribuir al ACS, y la infección es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con ACS.

- 55 La hipertensión pulmonar es actualmente una causa principal de morbilidad y mortalidad en la drepanocitosis. Véase, p. ej., De Castro y col. (2008) Am J Hematol, 83: 19-25; Gladwin y col. (2004) N Engl J Med 350: 886-895. La hipertensión pulmonar se ha documentado en 32 % de los adultos con drepanocitosis y está relacionada con crisis vasooclusivas y hemólisis [véase, p. ej., Machado y col. (2010) Chest, 137 (Supl. 6): 30S-38S]. Se cree que la hemoglobina exenta de células de la hemólisis reduce el óxido nítrico, un vasodilatador pulmonar, lo que contribuye a la vasooclusión [véase, p. ej., Wood y col. (2008) Free Radic Biol Med 44: 1506-1528]. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más  
60 complicaciones pulmonares de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., embolia grasa o de médula ósea, edema  
65



pulmonar, enfermedad pulmonar falciforme, hipertensión pulmonar, tromboembolismo y síndrome torácico agudo.

En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación hepática de la drepanocitosis. La patología hepática es común en la drepanocitosis, observándose hepatomegalia en ~90 % de los casos de autopsia [véase, p. ej., Bauer y col. (1980) *Am J med* 69: 833-837; Mills y col. (1988) *Arch Pathol Lab Med* 112: 290-294]. Los efectos de la drepanocitosis en el hígado incluyen falciformación intrasinusoidal con dilatación sinusoidal proximal, hiperplasia de células de Kupffer con eritrofagocitosis y hemosiderosis. También se han descrito necrosis focal, nódulos regenerativos y cirrosis en las necropsias. La vasooclusión puede conducir a obstrucción sinusoidal e isquemia, lo que da como resultado crisis hepáticas agudas por drepanocitosis. De manera similar al secuestro esplénico, los eritrocitos pueden ser secuestrados en el hígado, lo que conduce a anemia aguda [véase, p. ej., Lee y col. (1996) *Postgrad Med J* 72: 487-488]. El secuestro hepático también puede conducir a colestasis intrahepática [véase, p. ej., Shao y col. (1995) *Am J Gastroenterol* 90: 2045-2050]. La isquemia en los hepatocitos por episodios de falciformación también conduce a dilatación de los eritrocitos y colestasis intracanalicular. Algunas terapias usadas para tratar la drepanocitosis también contribuyen a la patología hepática. Por ejemplo, las transfusiones frecuentes conducen a deposición de hierro aumentada en las células de Kupffer (que puede conducir a sobrecarga de hierro) y aumentan el riesgo de infección por enfermedades de transmisión sanguínea tales como la hepatitis vírica. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más complicaciones hepáticas de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., insuficiencia hepática, hepatomegalia, secuestro hepático, colestasis intrahepática, coledocitis y sobrecarga de hierro.

En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación esplénica de la drepanocitosis. El secuestro esplénico, como se comentó anteriormente, se produce como resultado de la vasooclusión de los eritrocitos en el bazo. Las exacerbaciones agudas dan como resultado esplenomegalia y ocasionalmente infarto esplénico. Más habitualmente, el secuestro esplénico subclínico puede conducir a la pérdida gradual de la función esplénica, lo que conduce a hipoesplenía y asplenía funcionales. Esto, a su vez, puede conducir a una susceptibilidad aumentada a la sepsis como resultado de bacterias encapsuladas. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más complicaciones esplénicas de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., secuestro esplénico agudo o crónico, esplenomegalia, hipoesplenía, asplenía e infarto esplénico.

En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación renal de la drepanocitosis. Aproximadamente doce por ciento de las personas con drepanocitosis desarrollan insuficiencia renal [véase, p. ej., Powars y col. (2205) *Medicine* 84: 363-376; Scheinman, JI (2009) *Nat Clin Pract Nephrol* 5: 78-88]. La vasooclusión en los capilares rectos conduce a infarto microtrombótico y extravasación de eritrocitos a la médula renal. La sangre se vuelve más viscosa en la médula renal debido a la tensión de oxígeno baja, el pH bajo y la osmolalidad alta y, si es grave, puede contribuir a isquemia, infarto y necrosis papilar. La isquemia glomerular repetida conduce a glomeruloesclerosis. Las consecuencias clínicas de la lesión isquémica incluyen hematuria, proteinuria, capacidad de concentración reducida, acidosis tubular renal, función tubular proximal anómala, insuficiencia renal aguda y crónica e infecciones de las vías urinarias. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más complicaciones renales de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., insuficiencia renal aguda y/o crónica, pielonefritis y carcinoma medular renal.

En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación ósea y/o articular de la drepanocitosis. Las complicaciones óseas y articulares son una complicación común en pacientes con drepanocitosis [ver, p. ej., Hernigou y col. (1991) *J Bone Joint Surg Am*, 73: 81-92]. El dolor de los huesos pequeños de las manos y los pies, dactilitis, se produce con frecuencia en lactantes con drepanocitosis. Las consecuencias a largo plazo de la vasooclusión en la médula ósea incluyen infartos, necrosis y, en última instancia, cambios degenerativos. Debido a la hipoesplenía, las infecciones bacterianas son más comunes en la drepanocitosis. El hueso y la médula ósea infartados son sitios habituales de infección, que conduce a osteomielitis y artritis séptica. La osteonecrosis, o necrosis avascular, se produce después de un infarto con hueso y médula ósea. Los infartos son más comunes en huesos largos tales como el húmero, la tibia y el fémur. El soporte de peso crónico provoca estrés en las cabezas femorales anómalas y conduce a destrucción progresiva de las articulaciones y artritis. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un



polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más complicaciones óseas y/o articulares de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., infarto, necrosis, osteomielitis, artritis séptica, osteonecrosis y osteopenia.

5

En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación neurológica de la drepanocitosis. Aproximadamente 25 por ciento de las personas con drepanocitosis se ven afectadas por lesión neurológica [véase, p. ej., Ohene-Frempong y col. (1998) *Blood*, 91: 288-294; Verduzco y col. (2009) *Blood* 114: 5117-5125]. Las lesiones pueden ser agudas o crónicas. Los accidentes cerebrovasculares son más comunes en adultos, pero dependen del genotipo. Una persona con HbSS tiene el riesgo cerebrovascular máximo, con un 24 por ciento de probabilidad de sufrir un accidente cerebrovascular clínico sobre los 45 años. Los accidentes cerebrovasculares isquémicos son más comunes en niños menores de 9 años, mientras que los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos son más comunes en adultos. Los accidentes cerebrovasculares isquémicos se producen debido a la oclusión de arterias intracraneales grandes, lo que conduce a isquemia. La isquemia es secundaria a la oclusión de vasos más pequeños por los eritrocitos rígidos, agravada por anemia crónica, un estado de hipercoagulabilidad y lesión hemodinámica relacionada con el flujo al endotelio arterial, lo que aumenta adicionalmente la probabilidad de adhesión de los eritrocitos. Por el contrario, los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos se pueden producir en los espacios intraventricular, intraparenquimatoso y subaracnoideo [véase, p. ej., Anson y col. (1991) *J Neurosurg*, 75: 552-558]. La hemorragia intraventricular puede estar asociada a rotura de aneurismas de la arteria cerebral anterior o a extensión directa de la hemorragia intraparenquimatosa al ventrículo lateral o el tercer ventrículo. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o impedir una o más complicaciones neurológicas de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., aneurisma, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intraventricular.

En ciertos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción, opcionalmente en combinación con uno o más agentes y/o tratamientos complementarios para tratar la drepanocitosis, para tratar o impedir una complicación oftálmica de la drepanocitosis. Las complicaciones oculares en la drepanocitosis afectan principalmente a la retina [véase, p. ej., Downes y col. (2005) *Oftalmología*, 112: 1869-1875; Fadugbagbe y col. (2010) *Ann Trop Paediatr* 30: 19-26]. Como resultado de las crisis vasooclusivas, se produce isquemia retiniana periférica. Los vasos sanguíneos nuevos (formaciones en forma de abanico de mar) se forman principalmente cerca de los cruces arteriovenosos y se conocen como retinopatía falciforme proliferativa. Estos vasos nuevos pueden sangrar fácilmente, lo que provoca desprendimientos de retina por tracción y, en última instancia, ceguera. Los cambios retinianos no proliferativos también son más comunes en la drepanocitosis. En algunos aspectos, se pueden usar agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para tratar o prevenir una o más complicaciones oftálmicas de la drepanocitosis que incluyen, p. ej., isquemia retiniana periférica, retinopatía falciforme proliferativa, hemorragia vítrea, desprendimiento de retina y cambios retinianos no proliferativos.

En ciertos aspectos, se pueden administrar agentes antagonistas de ActRII de la descripción a un sujeto que lo necesita en combinación con uno o más agentes adicionales (p. ej., hidroxiurea, un antagonista de la EPO, EPO, un analgésico opioide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un corticosteroide, un agente quelante de hierro) o tratamientos complementarios (p. ej., transfusión de glóbulos rojos) para tratar la drepanocitosis o una o más complicaciones de la drepanocitosis.

La base del tratamiento para la mayoría de pacientes con drepanocitosis es el tratamiento complementario. Las opciones de tratamiento actuales para pacientes con drepanocitosis incluyen antibióticos, tratamiento del dolor, fluidos intravenosos, transfusión de sangre, cirugía y compuestos tales como hidroxiurea.

La hidroxiurea (p. ej. Droxia®) es un fármaco aprobado para el tratamiento de la drepanocitosis. La hidroxiurea es un fármaco citotóxico de fase S y se usa para terapia a largo plazo. Se cree que aumenta los niveles de hemoglobina F, lo que impide la formación de polímeros S y la falciformación de los glóbulos rojos. También se cree que aumenta la producción de NO. Un ensayo multicéntrico de hidroxiurea en adultos con drepanocitosis demostró que la hidroxiurea reducía la incidencia de episodios dolorosos a prácticamente la mitad. Sin embargo, actualmente, la hidroxiurea se usa solo en pacientes que padecen complicaciones graves de la drepanocitosis y que son capaces de seguir las pautas posológicas diarias. La creencia general es que la terapia con hidroxiurea es efectiva solo si se administra en un entorno estructurado con un potencial alto de cumplimiento terapéutico. Desafortunadamente, muchos pacientes con drepanocitosis son resistentes a la hidroxiurea. En algunos aspectos, las composiciones para uso de la presente descripción son para tratar la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y comprenden un antagonista de ActRII de la descripción para uso en combinación con hidroxiurea. En algunos aspectos, los procedimientos de la presente descripción se refieren a composiciones para uso en el tratamiento o la prevención de una o más complicaciones de



la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y comprenden un antagonista de ActRII de la descripción para uso en combinación con hidroxiurea.

- En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, anticuerpo, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), en combinación con transfusión de glóbulos rojos o sangre entera para tratar la anemia en pacientes con drepanocitosis o una o más complicaciones de la drepanocitosis. En pacientes que reciben transfusiones frecuentes de sangre entera o glóbulos rojos, los mecanismos normales de homeostasis del hierro se pueden ver sobrecargados, lo que en última instancia conduce a acumulación tóxica y potencialmente fatal de hierro en tejidos vitales tales como el corazón, el hígado y las glándulas endocrinas. Las transfusiones regulares de glóbulos rojos requieren exposición a diversas unidades de sangre de donantes y, por tanto, suponen un riesgo superior de aloinmunización. Las dificultades con el acceso vascular, la disponibilidad y el cumplimiento terapéutico de la quelación de hierro y el coste alto son algunas de las razones por las que puede ser beneficioso limitar el número de transfusiones de glóbulos rojos. En algunos aspectos, las composiciones para uso de la presente descripción se refieren a composiciones para uso en el tratamiento de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y comprenden un antagonista de ActRII de la descripción para uso en combinación con una o más transfusiones de células sanguíneas. En algunos aspectos, las composiciones para uso de la presente descripción son para uso en el tratamiento o la prevención de una o más complicaciones de la drepanocitosis en un sujeto que lo necesita y comprenden un antagonista de ActRII de la descripción para uso en combinación con una o más transfusiones de glóbulos rojos. En algunos aspectos, el tratamiento con uno o más antagonistas de ActRII de la descripción es efectivo para reducir la necesidad de transfusión en un paciente con drepanocitosis, p. ej., reduce la frecuencia y/o cantidad de transfusión de sangre necesaria para tratar con efectividad la drepanocitosis o una o más complicaciones de la drepanocitosis.
- En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), en combinación con una o más moléculas quelantes de hierro para favorecer la excreción de hierro en la orina y/o las heces e impedir o revertir de ese modo la sobrecarga tisular de hierro en pacientes con SCD. Los agentes quelantes de hierro efectivos deben ser capaces de unir y neutralizar selectivamente el hierro férrico, la forma oxidada del hierro no unida a transferrina que probablemente explica la mayor parte de la toxicidad del hierro a través de la producción catalítica de radicales hidroxilo y productos de la oxidación [véase, p. ej., Espósito y col. (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 octaédrica neutralizantes con átomos de hierro individuales en estequiometrías de 1:1 (agentes hexadentados), 2:1 (tridentados) o 3:1 (bidentados) [Kalinowski y col. (2005) *Pharmacol Rev* 57:547-583]. En general, los agentes quelantes de hierro efectivos también tienen un peso molecular relativamente bajo (p. ej., inferior a 700 daltons), con solubilidad tanto en agua como en lípidos para permitir el acceso a los tejidos afectados. Los ejemplos específicos de moléculas quelantes de hierro incluyen deferoxamina (también conocida como desferrioxamina B, desferoxamina B, DFO-B, DFOA, DFB o desferal), un agente hexadentado de origen bacteriano que requiere administración parenteral diaria, y los agentes sintéticos activos por vía oral deferiprone (bidentado; también conocido como Feriprox™) y deferasirox (tridentado; también conocido como bis-hidroxifeniltriazol, ICL670 o Exjade™). La politerapia que consiste en la administración en el mismo día de dos agentes quelantes de hierro se presenta prometedora en pacientes resistentes a la monoterapia de quelación y también para superar los problemas de cumplimiento terapéutico deficiente del paciente con la deferoxamina sola [Cao y col. (2011) *Pediatr Rep* 3(2):e17 y Galanello y col. (2010) *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86].

- Como se describe en esta solicitud, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea) para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos y poblaciones de pacientes seleccionadas. Los ejemplos de poblaciones de pacientes apropiadas incluyen aquellas con niveles de glóbulos rojos o hemoglobina indeseablemente bajos, tales como pacientes con anemia o drepanocitosis, y aquellas con riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos y hemoglobina, tales como pacientes que están a punto de someterse a cirugía mayor u otros procedimientos que pueden dar como resultado una pérdida sustancial de sangre. En algunos aspectos, un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos se trata con uno o más agentes antagonistas de ActRII para aumentar los niveles de glóbulos rojos y, a continuación, se le extrae sangre y se almacena para uso posterior en transfusiones.

- Se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o uno o más tratamientos complementarios adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea), para aumentar los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina y/o los niveles de hematocrito en un paciente que tiene anemia (p. ej., un paciente con drepanocitosis). Al observar los niveles de hemoglobina y/o hematocrito en seres humanos, un nivel inferior al normal para la categoría de edad y sexo apropiada puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de



10-12,5 g/dl, y típicamente de aproximadamente 11,0 g/dl, se considera que está dentro del intervalo normal en adultos sanos, aunque, en términos de terapia, un nivel objetivo inferior puede provocar menos efectos secundarios cardiovasculares. Véase, p. ej., Jacobs y col. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19. Alternativamente, los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupado por las células) se pueden usar como una  
 5 medida de anemia. Los niveles de hematocrito para individuos sanos varían de aproximadamente 41-51 % para hombres adultos y de 35-45 % para mujeres adultas. En ciertos aspectos, se puede tratar a un paciente con una pauta posológica destinada a restaurar al paciente a un nivel objetivo de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito. Como los niveles de hemoglobina y hematocrito varían de persona a persona, óptimamente, el nivel de hemoglobina y/o hematocrito objetivo se puede individualizar para cada paciente.

10

A menudo se observa anemia en pacientes que tienen una lesión tisular, una infección y/o una enfermedad crónica, particularmente cáncer. En algunos sujetos, la anemia se distingue por niveles de eritropoyetina bajos y/o una respuesta inadecuada a la eritropoyetina en la médula ósea. Véase, p. ej., Adamson, 2008, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17ª ed.; McGraw Hill, Nueva York, páginas 628-634. Las causas potenciales de anemia incluyen,  
 15 por ejemplo, pérdida de sangre, carencias nutricionales (p. ej., ingesta nutricional reducida de proteína), reacción a la medicación, diversos problemas asociados a la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado a un abanico de enfermedades y afecciones que incluyen, por ejemplo, trasplante de médula ósea; tumores sólidos (p. ej., cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de colon); tumores del sistema linfático (p. ej., leucemia linfocítica crónica, linfoma no hodgkiniano y linfoma de Hodgkin); tumores del sistema hematopoyético (p. ej.,  
 20 leucemia, un síndrome mielodisplásico y mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (p. ej., pautas que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (p. ej., psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); nefropatía o insuficiencia renal aguda o crónica, que incluye afecciones idiopáticas o congénitas; hepatopatía aguda o crónica; hemorragia aguda o  
 25 crónica; situaciones en las que no es posible la transfusión de glóbulos rojos debido a alo- o autoanticuerpos del paciente y/o por razones religiosas (p. ej., algunos testigos de Jehová); infecciones (p. ej., malaria y osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, drepanocitosis (anemia), talasemias; uso o abuso de drogas (p. ej., abuso de alcohol); pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar transfusiones; pacientes ancianos; y pacientes con enfermedad cardiopulmonar y anemia subyacentes que no pueden recibir transfusiones debido a  
 30 problemas de sobrecarga circulatoria. Véase, p. ej., Adamson (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17ª ed.; McGraw Hill, Nueva York, páginas 628-634. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales (p. ej., tratamiento con hidroxiurea) para tratar o impedir la anemia asociada a uno o más de los trastornos  
 35 o las afecciones descritos en esta solicitud.

Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos están asociados al propio proceso de enfermedad y a la generación de citocinas inflamatorias, tales como interleucina-1, interferón-gamma y factor de necrosis tumoral [Bron y col. (2001) *Semin Oncol* 28 (Supl. 8):1-6]. Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido  
 40 regulador de hierro clave, la hepcidina, inhibiendo de ese modo la exportación de hierro desde los macrófagos y limitando generalmente la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis [véase, p. ej., Ganz (2007) *J Am Soc Nephrol* 18:394-400]. La pérdida de sangre a través de diversas vías también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de la anemia debida a la progresión del cáncer varía con el tipo de cáncer, que varía desde 5 % en el cáncer de próstata hasta 90 % en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer tiene  
 45 consecuencias graves para los pacientes, que incluyen cansancio y calidad de vida reducida, eficacia del tratamiento reducida y mortalidad aumentada. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO, para tratar o impedir una anemia relacionada con el cáncer.

50

Una anemia hipoproliferativa puede ser consecuencia de una disfunción o insuficiencia primarias de la médula ósea. Las anemias hipoproliferativas incluyen: anemia por enfermedad crónica, anemia por nefropatía, anemia asociada a estados hipometabólicos y anemia asociada a cáncer. En cada uno de estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son *inapropiadamente bajos* para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen:  
 55 anemia ferropénica incipiente y anemia provocada por lesión en la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son *apropiadamente elevados* para el grado de anemia observado. Los ejemplos destacados serían mielosupresión provocada por fármacos contra el cáncer y/o quimioterápicos o por radioterapia contra el cáncer. Un análisis amplio de los ensayos clínicos encontró que se puede producir la anemia leve se puede producir en 100 % de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que la anemia más grave se puede producir en hasta 80 % de  
 60 tales pacientes [véase, p. ej., Groopman y col. (1999) *J Natl Cancer Inst* 91:1616-1634]. Los fármacos mielosupresores incluyen, por ejemplo: 1) agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas (p. ej., melfalán) y nitrosoureas (p. ej., estreptozocina); 2) antimetabolitos tales como antagonistas del ácido fólico (p. ej., metotrexato), análogos de la purina (p. ej., tioguanina) y análogos de la pirimidina (p. ej., gemcitabina); 3) antibióticos citotóxicos, tales como antraciclinas (p. ej., doxorubicina); 4) inhibidores de cinasas (p. ej., gefitinib); 5) inhibidores mitóticos tales como taxanos (p. ej., paclitaxel) y alcaloides de la vinca (p. ej., vinorelbina); 6) anticuerpos monoclonales (p. ej., rituximab) e 7) inhibidores  
 65



de topoisomerasas (p.ej., topotecán y etopósido). Además, las afecciones que son consecuencia de una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa de leve a moderada. Entre tales afecciones están los estados de carencia endocrina. Por ejemplo, se puede producir anemia en la enfermedad de Addison, el hipotiroidismo, el hiperparatiroidismo o en machos castrados o tratados con estrógeno. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO, para tratar o impedir una anemia hipoproliferativa.

La nefropatía crónica en ocasiones está asociada a anemia hipoproliferativa, y el grado de la anemia varía en cuanto a su gravedad con el nivel de insuficiencia renal. Tal anemia se debe principalmente a la producción inadecuada de eritropoyetina y a la supervivencia reducida de los glóbulos rojos. Normalmente, la nefropatía crónica avanza gradualmente a lo largo de un periodo de años o décadas a enfermedad terminal (estadio 5), momento en el que se requiere diálisis o trasplante de riñón para la supervivencia del paciente. La anemia a menudo se desarrolla de forma precoz en este proceso y empeora a medida que progresa la enfermedad. Las consecuencias clínicas de la anemia por nefropatía están bien documentadas e incluyen desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, función cognitiva deficiente, calidad de vida reducida y función inmunitaria alterada [véase, p. ej., Levin y col. (1999) *Am J Kidney Dis* 27:347-354; Nissenson (1992) *Am J Kidney Dis* 20 (Supl 1):21-24; Revicki y col. (1995) *Am J Kidney Dis* 25:548-554; Gafter y col., (1994) *Kidney Int* 45:224-231]. En algunos aspectos, se pueden uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO, para tratar o impedir la anemia asociada a insuficiencia o nefropatía agudas o crónicas.

La anemia como consecuencia de pérdida aguda de sangre de un volumen suficiente, tal como por un traumatismo o una hemorragia posparto, se conoce como anemia poshemorrágica aguda. La pérdida aguda de sangre provoca inicialmente hipovolemia sin anemia, ya que no hay reducción proporcional de los RBC junto con otros componentes de la sangre. Sin embargo, la hipovolemia desencadenará rápidamente mecanismos fisiológicos que desvían el líquido del compartimento extravascular al vascular, lo que da como resultado hemodilución y anemia. La pérdida de sangre, si es crónica, reduce gradualmente las reservas de hierro corporal y, en última instancia, conduce a carencia de hierro. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), para tratar la anemia como consecuencia de la pérdida aguda de sangre.

La anemia ferropénica es la etapa final de una progresión gradual de la carencia creciente de hierro, que incluye balance negativo de hierro y eritropoyesis ferropénica como etapas intermedias. La carencia de hierro puede ser consecuencia de la demanda de hierro aumentada, ingesta de hierro reducida o pérdida de hierro aumentada, como se ejemplifica en afecciones tales como embarazo, dieta inadecuada, absorción intestinal insuficiente, inflamación aguda o crónica y pérdida de sangre aguda o crónica. Con anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea sigue siendo hipoproliferativa y la morfología de los RBC es en gran medida normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede dar como resultado algunos RBC hipocrómicos microcíticos, y la transición a anemia ferropénica grave va acompañada de hiperproliferación de la médula ósea y RBC microcíticos e hipocrómicos cada vez más prevalentes [véase, p. ej., Adamson (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17ª ed.; McGraw Hill, Nueva York, páginas 628-634]. La terapia apropiada para la anemia ferropénica depende de su causa y gravedad, con los preparados orales de hierro, las formulaciones parenterales de hierro y la transfusión de RBC como opciones convencionales principales. En algunos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO, para tratar una carencia crónica de hierro.

El síndrome mielodisplásico (MDS) es un conjunto heterogéneo de afecciones hematológicas caracterizadas por producción inefectiva de células sanguíneas mieloides y riesgo de transformación a leucemia mielógena aguda. En los pacientes con MDS, las células madre sanguíneas no maduran para convertirse en glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas sanos. Los trastornos de MDS incluyen anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, citopenia refractaria con displasia multilineal y síndrome mielodisplásico asociado a una anomalía aislada del cromosoma 5q. Como estos trastornos se presentan como defectos irreversibles tanto en la cantidad como en la calidad de las células hematopoyéticas, la mayoría de los pacientes con MDS padecen anemia crónica. Por lo tanto, los pacientes con MDS requieren en última instancia transfusiones de sangre y/o tratamiento con factores de crecimiento (p. ej., eritropoyetina o G-CSF) para aumentar los niveles de glóbulos rojos. Sin embargo, muchos pacientes con MDS desarrollan efectos secundarios debido a la frecuencia de tales terapias. Por ejemplo, los pacientes que reciben transfusiones de glóbulos rojos frecuentes pueden presentar lesiones en los tejidos y órganos debido a la acumulación de hierro adicional. Por consiguiente, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO, para tratar pacientes que padecen MDS. En ciertos aspectos, los pacientes que padecen MDS se pueden tratar usando uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO. En otros aspectos, un paciente que padece



MDS se puede tratar usando una combinación de uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) y uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar el MDS que incluyen, por ejemplo, talidomida, lenalidomida, azacitadina, decitabina, eritropoyetinas, deferoxamina, globulina antitumórica y filgrastim (G-CSF).

5 Como se emplea en esta solicitud, “en combinación con” o “administración conjunta” se refiere a cualquier forma de administración de tal manera que las terapias adicionales (p. ej., segunda, tercera, cuarta, etc.) siguen siendo efectivas en el cuerpo (p. ej., múltiples compuestos son efectivos simultáneamente en el paciente, lo que puede incluir efectos sinérgicos de esos compuestos). La eficacia puede no correlacionarse con la concentración mensurable del agente en sangre, suero o plasma. Por ejemplo, los diferentes compuestos terapéuticos se pueden administrar en la misma formulación o en formulaciones independientes, concomitante o secuencialmente, y en diferentes programas. Por tanto, un individuo que recibe tal tratamiento se puede beneficiar de un efecto combinado de diferentes terapias. Se pueden administrar uno o más agentes antagonistas de GDF11 y/o activina B (opcionalmente antagonistas adicionales de uno o más de GDF8, activina A, activina C, activina E y BMP6) de la descripción simultáneamente con, antes o después de, uno o más de otros agentes adicionales o tratamientos complementarios distintos. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o con una programación determinados para ese agente particular. La combinación particular que se va a emplear en una pauta tendrá en cuenta la compatibilidad del antagonista de la presente descripción con la terapia y/o el efecto terapéutico deseado que se va a conseguir.

20 En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) en combinación con hepcidina o un agonista de la hepcidina para tratar la drepanocitosis, particularmente complicaciones de la drepanocitosis asociadas a sobrecarga de hierro. Un polipéptido circulante producido principalmente en el hígado, la hepcidina, se considera un regulador maestro del metabolismo del hierro en virtud de su capacidad para inducir la degradación de la ferroportina, una proteína exportadora de hierro ubicada en los enterocitos, hepatocitos y macrófagos absorbentes. En términos generales, la hepcidina reduce la disponibilidad de hierro extracelular, por lo que los agonistas de la hepcidina pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la drepanocitosis, particularmente de complicaciones de la drepanocitosis asociadas a sobrecarga de hierro.

30 Uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de la EPO, también serían apropiados para tratar anemias por maduración desordenada de los RBC, que se caracterizan en parte por RBC de tamaño inferior (microcíticos), de tamaño superior (macrocíticos), deformes o de color anómalo (hipocrómicos).

35 En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona composiciones para uso en el tratamiento o la prevención de anemia en un individuo que lo necesita que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) para uso en combinación con un activador del receptor de EPO (ESA). En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) en combinación con ESA para reducir la dosis requerida de estos activadores en pacientes que son susceptibles a efectos adversos de los ESA. Estos procedimientos se pueden usar para tratamientos terapéuticos y profilácticos de un paciente.

45 Se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (por ejemplo, un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) en combinación con activadores del receptor de EPO para conseguir un aumento de glóbulos rojos, particularmente en intervalos de dosis inferiores. Esto puede ser beneficioso para reducir los efectos inespecíficos y riesgos conocidos asociados a dosis altas de activadores del receptor de EPO. Los efectos adversos principales de los ESA incluyen, por ejemplo, un aumento excesivo de los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles de hematocrito elevados pueden conducir a hipertensión (más particularmente a agravamiento de la hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos adversos de los ESA que se han descrito, algunos de los cuales se relacionan con la hipertensión, son cefalea, síndrome pseudogripal, obstrucción de derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debidas a trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplasia de glóbulos rojos. Véase, p. ej., Singibarti (1994) J. Clin Investig 72 (supl. 6), S36-S43; Horl y col. (2000) Nephrol Dial Transplant 15 (supl. 4), 51-56; Delanty y col. (1997) Neurology 49, 686-689 y Bunn (2002) N Engl J Med 346 (7), 522-523.

Siempre que los antagonistas de la presente descripción actúen mediante un mecanismo diferente a los ESA, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a los ESA. Por ejemplo, un antagonista de ActRII de la presente descripción puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis de normal a aumentada (>300 UI/kg/semana) de ESA no da como resultado el aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel objetivo. Se encuentran pacientes con una respuesta inadecuada a los ESA para todos los tipos de anemia, pero los números más altos de pacientes que no responden al tratamiento se han observado a menudo particularmente en pacientes con cáncer y nefropatía terminal.



Una respuesta inadecuada a los ESA puede ser constitutiva (observada tras el primer tratamiento con ESA) o adquirida (observada tras el tratamiento repetido con ESA).

- En ciertos aspectos, se pueden usar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), opcionalmente combinados con un activador del receptor de EPO y/o una o más terapias adicionales, en combinación con hepcidina, un análogo de la hepcidina o un activador del receptor de hepcidina para tratar pacientes con SCD, particularmente para complicaciones asociadas a sobrecarga de hierro. Un polipéptido circulante producido principalmente en el hígado, la hepcidina, se considera un regulador maestro del metabolismo del hierro en virtud de su capacidad para inducir la degradación de la ferroportina, una proteína exportadora de hierro ubicada en los enterocitos, hepatocitos y macrófagos absorbentes. En términos generales, la hepcidina reduce la disponibilidad de hierro extracelular, por lo que la hepcidina, los análogos de la hepcidina o los activadores del receptor de hepcidina pueden ser beneficiosos en el tratamiento de pacientes con SCD, particularmente para complicaciones asociadas a sobrecarga de hierro.
- En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar a un paciente que ha sido tratado con, o es candidato para ser tratado con, uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) midiendo uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos se pueden usar para evaluar la dosis apropiada para un paciente que es candidato para ser tratado con el antagonista de la presente descripción, para supervisar los parámetros hematológicos durante el tratamiento, para evaluar si se debe ajustar la dosis durante el tratamiento con uno o más antagonistas de la descripción y/o para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada de uno o más antagonistas de la descripción. Si uno o más de los parámetros hematológicos están fuera del nivel normal, la administración de uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) se puede reducir, retrasar o cancelar.

Los parámetros hematológicos que se pueden medir según los procedimientos proporcionados en esta solicitud incluyen, por ejemplo, los niveles de glóbulos rojos, la tensión arterial, las reservas de hierro y otros agentes encontrados en los fluidos corporales que se correlacionan con niveles de glóbulos rojos aumentados, usando procedimientos reconocidos en la técnica. Tales parámetros se pueden determinar usando una muestra de sangre de un paciente. Los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina o niveles de hematocrito pueden provocar aumentos en la tensión arterial.

En un aspecto, si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en la parte alta del intervalo normal, en un paciente que es candidato para ser tratado con uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), entonces, el inicio de la administración del uno o más antagonistas de la descripción se puede retrasar hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable, de forma natural o por intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, entonces el paciente se puede tratar con un agente hipotensor con el fin de reducir la tensión arterial del paciente. Se puede usar cualquier agente hipotensor apropiado para la afección individual del paciente, lo que incluye, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (que incluyen alfabloqueadores y betabloqueadores), vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) o bloqueadores del receptor de angiotensina II. La tensión arterial se puede tratar alternativamente usando una pauta de dieta y ejercicio. Similarmente, si un paciente candidato tiene reservas de hierro inferiores a las normales, o en la parte baja de los valores normales, entonces, el paciente se puede tratar con una pauta apropiada de dieta y/o suplementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a un nivel normal o aceptable. Para pacientes que tienen niveles superiores a los normales de glóbulos rojos y/o hemoglobina, la administración de uno o más antagonistas de la descripción se puede retrasar hasta que los niveles hayan vuelto a un nivel normal o aceptable.

En ciertas realizaciones, si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en la parte alta del intervalo normal, en un paciente que es candidato para ser tratado con uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.), el inicio de la administración no se puede retrasar. Sin embargo, la cantidad o frecuencia de administración de dosis del uno o más antagonistas de la descripción se puede ajustar a una cantidad que reduciría el riesgo de un aumento inaceptable de los parámetros hematológicos después de la administración del uno o más antagonistas de la descripción. Alternativamente, se puede desarrollar una pauta terapéutica para el paciente que combina uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) con un agente terapéutico que corrige el nivel indeseable del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente tiene hipertensión arterial, se puede diseñar una pauta terapéutica que implica la administración de uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) y un agente hipotensor. Para un paciente que tiene reservas de hierro inferiores a las deseadas, se puede desarrollar una pauta terapéutica que implica uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (por ejemplo, un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) y aporte



complementario de hierro.

En un aspecto, se pueden establecer uno o más parámetros de referencia de uno o más parámetros hematológicos para un paciente que es candidato para ser tratado con uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) y una pauta posológica apropiada para ese paciente en función del uno o más valores de referencia. Alternativamente, los parámetros de referencia establecidos en función de los antecedentes de un paciente se podrían usar para informar de una pauta posológica de antagonista apropiada 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 el uno o más antagonistas de la descripción. Los valores de referencia de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) también se pueden usar como valores comparativos relevantes para supervisar cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el uno o más antagonistas de la descripción.

En ciertos aspectos, se miden uno o más parámetros hematológicos en pacientes que están siendo tratados con uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido ActRIIB, una trampa GDF, etc.). Los parámetros hematológicos se pueden usar para supervisar al paciente durante el tratamiento y permiten el ajuste o la finalización de la administración del uno o más antagonistas de la descripción o de la administración adicional de otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) da como resultado un aumento de la tensión arterial, el nivel de glóbulos rojos o el nivel de hemoglobina, o una reducción de las reservas de hierro, entonces, la dosis del uno o más antagonistas de la descripción se puede reducir en cantidad o frecuencia con el fin de reducir los efectos del uno o más antagonistas de la descripción sobre el uno o más parámetros hematológicos. Si la administración de uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) da lugar a un cambio en uno o más parámetros hematológicos que es adverso para el paciente, entonces, la administración del uno o más antagonistas de la descripción se puede finalizar temporalmente, hasta que el uno o más parámetros hematológicos vuelvan a un nivel aceptable, o permanentemente. Similarmente, si uno o más parámetros hematológicos no son llevados a un intervalo aceptable después de reducir la dosis o frecuencia de administración del uno o más antagonistas de la descripción, entonces, la administración se puede finalizar. Como alternativa, o además de, reducir o finalizar la administración del uno o más antagonistas de la descripción, se puede administrar al paciente un agente terapéutico adicional que corrige el nivel indeseable del uno o más 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 agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) tiene hipertensión arterial, entonces, la administración del uno o más antagonistas de la descripción puede continuar al mismo nivel y se añade un agente hipotensor a la pauta terapéutica, la administración del uno o más antagonistas de la descripción se puede reducir (p. ej., en cantidad y/o frecuencia) y se añade un agente hipotensor a la pauta posológica, o se puede finalizar la administración del uno o más antagonistas de la descripción y tratar al paciente con un agente hipotensor.

## 6 Composiciones farmacéuticas

En ciertos aspectos, se pueden administrar uno o más agentes antagonistas de ActRII de la descripción (p. ej., un antagonista de GDF-ActRII, un polipéptido de ActRIIA, un polipéptido de ActRIIB, una trampa de GDF, etc.) solos o como un componente de una formulación farmacéutica (también denominada composición terapéutica o composición farmacéutica). El término formulación farmacéutica se refiere a un preparado que es de tal forma que permite que la actividad biológica de un principio activo (p. ej., un agente de la presente descripción) contenido en el mismo sea efectiva y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se le administraría la formulación. Los compuestos objetivo se pueden formular para administración de cualquier manera conveniente para uso en medicina humana o veterinaria. Por ejemplo, uno o más agentes de la presente descripción se pueden formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que generalmente no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante y/o conservante. En general, las formulaciones farmacéuticas para uso en la presente descripción están en una forma exenta de pirógenos fisiológicamente aceptable cuando se administran a un sujeto. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los descritos en esta solicitud, que se pueden incluir opcionalmente en la formulación como se describió anteriormente, se pueden administrar en combinación con los agentes objetivo en las composiciones para uso de la presente descripción.

Típicamente, los compuestos se administrarán por vía parenteral [p. ej., mediante inyección intravenosa (i.v.), inyección intraarterial, inyección intraósea, inyección intramuscular, inyección intratecal, inyección subcutánea o inyección intradérmica]. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden



comprender uno o más agentes de la descripción en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas y farmacéuticamente aceptables, o con polvos estériles que se pueden reconstituir para proporcionar soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso. Las soluciones o dispersiones inyectables pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes o solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (p. ej., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, etc.), aceites vegetales (p. ej., aceite de oliva), ésteres orgánicos inyectables (p. ej., oleato de etilo) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento (p. ej. lecitina), mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

En algunos aspectos, una composición para uso de la presente descripción se administra por vía sistémica, o local, desde un implante o dispositivo. Además, la composición farmacéutica se puede encapsular o inyectar en una forma para administración a un punto de tejido objetivo (p. ej. médula ósea o músculo). En ciertos aspectos, las composiciones de la presente descripción pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más de los agentes de la presente descripción a un punto de tejido objetivo (p. ej., médula ósea o músculo), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar la liberación lenta de uno o más agentes de la presente descripción. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz puede estar basada en uno o más de: biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de la interfase. La aplicación particular de las composiciones objetivo definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y están biológicamente bien definidos, lo que incluye, por ejemplo, el hueso o el colágeno dérmico. Las matrices adicionales están compuestas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables ni están químicamente definidas, lo que incluye, por ejemplo, hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, lo que incluye, por ejemplo, ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden estar alteradas en cuanto a la composición (p. ej., aluminato-fosfato de calcio) y procesarse para alterar uno o más de tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de la partícula y biodegradabilidad.

En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base saborizada, tal como sucrosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, un elixir o jarabe, o pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sucrosa y acacia) y/o un enjuague bucal, conteniendo, cada una, una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente descripción y opcionalmente uno o más principios activos distintos. Un compuesto de la presente descripción y opcionalmente uno o más principios activos distintos también se pueden administrar como un bolo, un electuario o una pasta.

En las formas farmacéuticas sólidas para administración oral (p. ej., cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos y gránulos), se pueden mezclar uno o más compuestos de la presente descripción con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, citrato de sodio o fosfato dicálcico, una carga o un extensor (p. ej., un almidón, lactosa, sucrosa, glucosa, manitol y ácido silícico), un aglutinante (p. ej., carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa y acacia), un humectante (p. ej., glicerol), un agente desintegrante (p. ej., agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, un silicato y carbonato de sodio), un agente retardante de la solución (p. ej., parafina), un acelerante de la absorción (p. ej., un compuesto de amonio cuaternario) un agente humectante (p. ej., alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), un absorbente (p. ej., arcilla de caolín y bentonita), un lubricante (p. ej., un talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio), un agente colorante y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y pastillas, la formulación (composición) farmacéutica (composición) también puede comprender un agente tamponador. Las composiciones sólidas de tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina duras y blandas usando uno o más excipientes que incluyen, p. ej., lactosa o un glúcido de la leche, así como un polietilenglicol de peso molecular alto.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral de la composición farmacéutica incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del uno o más principios activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener un diluyente inerte usado habitualmente en la técnica, lo que incluye, por ejemplo, agua u otro disolvente, un agente solubilizante y/o emulsionante [p. ej., alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol o 1,3-butilenglicol), un aceite (p. ej., aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, un polietilenglicol, un éster de ácido graso de sorbitano y mezclas de los mismos].



Además de los diluyentes inertes, la formulación oral también puede incluir un adyuvante, lo que incluye, por ejemplo, un agente humectante, un agente emulsionante y de suspensión, un agente edulcorante, un agente saborizante, un agente colorante, un perfume, un agente conservante y combinaciones de los mismos.

- 5 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión que incluyen, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol, un éster de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto y mezclas de los mismos.

- La prevención de la acción y/o el crecimiento de microorganismos se puede garantizar mediante la inclusión de  
10 diversos agentes antibacterianos y antifúngicos que incluyen, por ejemplo, parabeno, clorobutanol y ácido fenol sórbico.

- En ciertos aspectos, puede ser deseable incluir un agente isotónico, lo que incluye, por ejemplo, un glúcido o cloruro de sodio, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable se puede  
15 lograr mediante la inclusión de un agente que retarda la absorción, lo que incluye, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- Se entiende que la pauta posológica será determinada por el médico responsable del tratamiento considerando diversos factores que modifican la acción del uno o más agentes de la presente descripción. Los diversos factores  
20 incluyen, pero no se limitan a, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina, el recuento de glóbulos rojos objetivo deseado, la edad del paciente, el sexo del paciente, la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que puede estar contribuyendo a un nivel de glóbulos rojos deprimido, el momento de administración y otros factores clínicos. La adición de otros agentes activos conocidos a la composición final también puede afectar a la dosis. El progreso se puede supervisar mediante la evaluación periódica de uno o más de los niveles  
25 de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina, los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

- En ciertos aspectos, la presente descripción también proporciona genoterapia para la producción *in vivo* de uno o más de los agentes de la presente descripción. Tal terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de  
30 las secuencias de agentes en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La administración de las secuencias de agentes se puede conseguir, por ejemplo, usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. La administración terapéutica preferida de una o más de las secuencias de agentes de la descripción es el uso de liposomas dirigidos.

- 35 Diversos vectores víricos que se pueden utilizar para genoterapia como se enseña en esta solicitud incluyen adenovirus, virus del herpes, vacunas o un virus de ARN (p. ej., un retrovirus). El vector retrovírico puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovíricos en los que se puede insertar un único gen externo incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios  
40 vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de manera que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovíricos se pueden hacer específicos de la diana fijando, por ejemplo, un glúcido, un glucolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra usando un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retrovírico o fijar a una  
45 envoltura vírica para permitir la administración específica a la diana del vector retrovírico que contiene uno o más de los agentes de la presente descripción.

- Alternativamente, se pueden transfectar directamente células de cultivo tisular con plásmidos que codifican genes estructurales retrovíricos (gaga, pol y env) mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se  
50 transfectan a continuación con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovírico en el medio de cultivo.

- Otro sistema de administración dirigida para uno o más de los agentes de la presente descripción es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen, por ejemplo, complejos de macromoléculas,  
55 nanocápsulas, microesferas, esferas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. En ciertos aspectos, el sistema coloidal preferido de esta descripción es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y administrar a las células en una forma biológicamente activa [véase, p. ej., Fraley, y col. (1981) Trends Biochem. Sci., 6:77]. Los procedimientos para  
60 la transferencia genética eficiente usando un vehículo liposómico se conocen en la técnica, [véase, p. ej., Mannino y col. (1988) Biotechniques, 6:682, 1988].e.g.,

- La composición del liposoma normalmente es una combinación de fosfolípidos, que puede incluir un esteroide (p. ej., colesterol). Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes  
65 divalentes. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos, que incluyen, por ejemplo, un compuesto de



fosfatidilo (p. ej., fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípido, cerebrósido o un gangliósido), fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de liposomas también es posible en base a, por ejemplo, la especificidad por órganos, especificidad por células y especificidad por orgánulos, y se conoce en la técnica.

5

## EJEMPLIFICACIÓN

La descripción que ahora se describe en general, se entenderá más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente descripción y no están destinados a limitar la descripción.

10

### Ejemplo 1: Proteínas de fusión ActRIIA-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActRIIA soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIA humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo intermedio. Las construcciones se denominan ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc, respectivamente.

15

ActRIIA-hFc se muestra a continuación como purificada a partir de estirpes de células CHO (SEQ ID NO: 22):

```

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEI
VKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNP
VTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQK
20  SLSLSPGK

```

20

Las proteínas ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc se expresaron en estirpes de células CHO.

Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

25

- (i) melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 23)
- (ii) activador del plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 24)
- (iii) natural: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 25).

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

30

```

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTG
VEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFC
CCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:26)

```



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

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGC  
 AGTCTTCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGT  
 CTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACC  
 GTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATT  
 TCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTA  
 TGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTGTC  
 TGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCA  
 CACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCA  
 CACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
 TTCCCCC AAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT  
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCG  
 AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC  
 TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG  
 TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC  
 CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT  
 CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT  
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC  
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:27)

Tanto ActRIIA-hFc como ActRIIA-mFc fueron notablemente susceptibles de expresión recombinante. Como se muestra en la Figura 3, la proteína se purificó como un único pico de proteína bien definido. La secuenciación aminoterminal reveló una única secuencia de -ILGRSETQE (SEQ ID NO: 34). La purificación se podría conseguir mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en columna de Q Sepharose, cromatografía en columna de fenilsefaroza, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración vírica e intercambio de tampón. La proteína ActRIIA-hFc se purificó a una pureza de >98 % como se determina mediante cromatografía de exclusión molecular y >95 % como se determina mediante SDS PAGE.

ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc presentaron una afinidad alta por los ligandos, particularmente la activina A. Se inmovilizaron GDF-11 o activina A en un chip CM5 Biacore™ usando un procedimiento de acoplamiento de amina estándar. Las proteínas ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc se cargaron en el sistema y se midió la unión. ActRIIA-hFc se unió a la activina con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $5 \times 10^{-12}$  y se unió al GDF11 con una  $K_D$  de  $9,96 \times 10^{-9}$ . Véase la Figura 4. ActRIIA-mFc se comportó de manera similar.

La ActRIIA-hFc fue muy estable en los estudios farmacocinéticos. Se administró a las ratas una dosis de 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActRIIA-hFc y se midieron los niveles plasmáticos de la proteína a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio independiente, las ratas recibieron dosis de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En ratas, ActRIIA-hFc tuvo una semivida sérica de 11-14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron bastante altos después de dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente). En macacos cangrejeros, la semivida plasmática fue sustancialmente superior a 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.

### **Ejemplo 2: Caracterización de una proteína ActRIIA-hFc**

La proteína de fusión ActRIIA-Fc se expresó en células CHO-DUKX B11 transfectadas establemente a partir de un



vector pAID4 (ori/potenciador de SV40, promotor de CMV), usando una secuencia líder de plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 9. La proteína, purificada como se describió anteriormente en el Ejemplo 1, tenía una secuencia de SEQ ID NO: 22. La porción Fc es una secuencia de Fc de IgG1 humana, como se muestra en la SEQ ID NO: 22. El análisis proteico revela que la proteína de fusión ActRIIA-hFc se forma como un homodímero con enlaces disulfuro.

- 5 El material expresado en células CHO tiene una afinidad superior por el ligando activina B a la descrita para una proteína de fusión ActRIIA-hFc expresada en células 293 humanas [véase, del Re y col. (2004) J Biol Chem. 279(51):53126-53135]. Adicionalmente, el uso de la secuencia líder de TPA proporcionó mayor producción que otras secuencias líder y, a diferencia de la ActRIIA-Fc expresada con una secuencia líder natural, proporcionó una secuencia aminoterminal muy pura. El uso de la secuencia líder natural dio como resultado dos especies principales de ActRIIA-Fc que tienen, cada una, una secuencia aminoterminal diferente.

### **Ejemplo 3. ActRIIA-hFc aumenta los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos**

- 15 El estudio empleó cuatro grupos de cinco monos cangrejeros machos y cinco hembras cada uno, con tres por sexo y grupo programados para finalización el Día 29, y dos por sexo y grupo programados para finalización el Día 57. A cada animal se le administró el vehículo (Grupo 1) o ActRIIA-Fc en dosis de 1, 10 o 30 mg/kg (Grupos 2, 3 y 4, respectivamente) mediante inyección intravenosa (i.v.) los Días 1, 8, 15 y 22. El volumen de las dosis se mantuvo en 3 mL/kg. Se evaluaron varias medidas de niveles de glóbulos rojos dos días antes de la primera administración y en los días 15, 29 y 57 (para los dos animales restantes) después de la primera administración.

- La ActRIIA-hFc provocó aumentos estadísticamente significativos en los parámetros medios de los glóbulos rojos [recuento de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT)] para machos y hembras, en todos los niveles de dosis e intervalos temporales a lo largo del estudio, con elevaciones simultáneas de los recuentos absolutos y relativos de reticulocitos (ARTC; RTC). Véanse las Figuras 5-8.

Se calculó la significación estadística para cada grupo de tratamiento con respecto a la media del grupo de tratamiento en el momento inicial.

- 30 Notablemente, los aumentos en los números de glóbulos rojos y los niveles de hemoglobina son aproximadamente equivalentes en magnitud a los efectos descritos con la eritropoyetina. La aparición de estos efectos es más rápida con ActRIIA-Fc que con eritropoyetina.

Se observaron resultados similares con ratas y ratones.

- 35 **Ejemplo 4: ActRIIA-hFc aumenta los niveles de glóbulos rojos y los marcadores de formación ósea en pacientes humanos**

- La proteína de fusión ActRIIA-hFc descrita en el Ejemplo 1 se administró a sujetos humanos en un estudio aleatorizado, con doble ocultación y controlado con placebo que se realizó para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres posmenopáusicas sanas. Se dividieron aleatoriamente cuarenta y ocho sujetos en cohortes de 6 para que recibieran una dosis única de ActRIIA-hFc o placebo (5 tratamiento activo:1 placebo). Los niveles de dosis variaron de 0,01 a 3,0 mg/kg por vía intravenosa (i.v.) y de 0,03 a 0,1 mg/kg por vía subcutánea (s.c.). Todos los sujetos se sometieron a seguimiento durante 120 días. Además de los análisis farmacocinéticos (FC), la actividad biológica de ActRIIA-hFc también se evaluó mediante la medición de marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea, así como de los niveles de FSH.

- Para buscar cambios potenciales, se examinaron pormenorizadamente la hemoglobina y los números de RBC de todos los sujetos durante el transcurso del estudio y se compararon con los niveles iniciales. Los recuentos de plaquetas se compararon durante el mismo tiempo que el control. No hubo cambios clínicamente significativos de los valores iniciales a lo largo del tiempo para los recuentos de plaquetas.

- El análisis farmacocinético (FC) de ActRIIA-hFc reveló un perfil lineal con la dosis y una semivida media de aproximadamente 25-32 días. El área bajo la curva (AUC) para ActRIIA-hFc estaba relacionada linealmente con la dosis y la absorción después de la administración s.c. fue esencialmente completa. Véanse las Figuras 9 y 10. Estos datos indican que la administración s.c. es una estrategia deseable de administración porque proporciona biodisponibilidad y semivida sérica equivalentes para el fármaco a la vez que evita el pico en las concentraciones séricas de fármaco asociado a los primeros días de la administración i.v. (véase la Figura 10). ActRIIA-hFc provocó un aumento rápido, mantenido y dependiente de la dosis de los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica del hueso (BAP), que es un marcador del crecimiento óseo anabólico, y una reducción dependiente de la dosis en los niveles de telopeptido carboxiterminal del colágeno tipo 1 y fosfatasa ácida resistente a tartratos 5b, que son marcadores de la resorción ósea. Otros marcadores, tales como P1NP, no presentaron resultados concluyentes. Los niveles de BAP demostraron efectos prácticamente saturantes a la dosis máxima de fármaco, lo que indica que los efectos de concentraciones semimáximas de este biomarcador óseo anabólico se podrían conseguir a una dosis de 0,3 mg/kg, con aumentos que varían hasta 3 mg/kg. Calculada como una relación de efecto farmacodinámico a AUC



para el fármaco, la CE50 fue 51,465 (día\* ng/ml) (véase la Figura 11). Estos cambios en los biomarcadores óseos se mantuvieron durante aproximadamente 120 días a los niveles de dosis máximos ensayados. También hubo una reducción dependiente de la dosis de los niveles de FSH séricos compatible con la inhibición de la activina.

- 5 En general, hubo una reducción muy pequeña no relacionada con el fármaco en la hemoglobina durante la primera semana del estudio, probablemente relacionada con la extracción de sangre del estudio en los grupos de 0,01 y 0,03 mg/kg si se administraba por vía i.v. o s.c. Los resultados de la hemoglobina con dosis s.c. e i.v. de 0,1 mg/kg fueron estables o presentaron aumentos moderados en el Día 8-15. En el nivel de dosis i.v. de 0,3 mg/kg, hubo un aumento claro de los niveles de HGB observados ya en el Día 2 y a menudo con picos en el Día 15-29 que no se observaban en los sujetos tratados con placebo. En la dosis i.v. de 1,0 mg/kg y la dosis i.v. de 3,0 mg/kg, se observaron aumentos de hemoglobina medios superiores a 1 g/dl en respuesta a la dosis única, con aumentos correspondientes en los recuentos de RBC y el hematocrito. Estos parámetros hematológicos alcanzaron su punto máximo aproximadamente 60 días después de la dosis y se redujeron sustancialmente para el día 120. Esto indica que la administración con el fin de aumentar los niveles de glóbulos rojos puede ser más efectiva si se realiza a intervalos inferiores a 120 días (es decir, antes de volver al momento inicial), pudiendo ser deseables intervalos de administración de 90 días o menos o de 60 días o menos. Para consultar un resumen de los cambios hematológicos, véanse las Figuras 12-15.

En general, ActRIIA-hFc presentó un efecto dependiente de la dosis sobre los recuentos de glóbulos rojos y los recuentos de reticulocitos.

#### **Ejemplo 5: Tratamiento de un paciente anémico con ActRIIA-hFc**

- Se diseñó un estudio clínico para tratar pacientes con múltiples dosis de ActRIIA-hFc, a tres niveles de dosis de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg, con administración cada 30 días. Los sujetos sanos normales del ensayo presentaron un aumento de la hemoglobina y el hematocrito que es compatible con los aumentos observados en el ensayo clínico de Fase I descrito en el Ejemplo 4, a excepción de que, en algunos aspectos, la hemoglobina (Hg) y el hematocrito (Hct) están elevados por encima del intervalo normal. Un paciente anémico con niveles de hemoglobina de aproximadamente 7,5 g/dL también recibió dos dosis al nivel de 1 mg/kg, lo que dio como resultado un nivel de hemoglobina de aproximadamente 10,5 g/dL después de dos meses. La anemia del paciente era una anemia microcítica, que se creyó que era provocada por una carencia crónica de hierro.

Se ha demostrado además que las proteínas de fusión ActRIIA-Fc son efectivas para aumentar los niveles de glóbulos rojos en diversos modelos de anemia que incluyen, por ejemplo, anemia inducida por quimioterapia y anemia asociada a nefropatía crónica (véase, p. ej., la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2010/0028331).

#### **Ejemplo 6: Proteínas ActRIIA-Fc alternativas**

- Un abanico de variantes de ActRIIA que se pueden usar según los procedimientos descritos en esta solicitud se describen en la solicitud de patente internacional publicada como WO2006/012627 (véanse, p. ej., las páginas 55-58). Una construcción alternativa puede tener una eliminación de la cola carboxiterminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRIIA). La secuencia para tal construcción se presenta a continuación (porción Fc subrayada) (SEQ ID NO: 28):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG  
CWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

#### **Ejemplo 7: Generación de proteínas de fusión 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 enlazador mínimo (tres aminoácidos de glicina) intermedio. Las construcciones se denominan ActRIIB-hFc y ActRIIB-mFc, respectivamente.



GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT  
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPGK

ActRIIB-hFc se muestra a continuación como purificada a partir de estirpes de células CHO (SEQ ID NO: 29):

5

Las proteínas ActRIIB-hFc y ActRIIA-mFc se expresaron en estirpes de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

- 10 (i) melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 23)  
(ii) activador del plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 24)  
(iii) natural: MGAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 30).

La forma seleccionada emplea la secuencia líder de TPA y tiene la secuencia de aminoácidos sin procesar siguiente (SEQ ID NO: 31):

15

MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE  
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE  
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Este polipéptido es codificado por la secuencia de ácido nucleico siguiente (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  
GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG  
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG  
CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC  
ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGGAAC 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 GCCCTCCCAG



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 aminoterminal del material producido a partir de células CHO reveló una secuencia principal de-  
 GRGEAE (SEQ ID NO: 33). Notablemente, otras construcciones descritas en la bibliografía comienzan con una  
 5 secuencia -SGR....

La purificación se podría conseguir mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por  
 ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en  
 columna de Q Sepharose, cromatografía en columna de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión molecular y  
 10 cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración vírica e intercambio de  
 tampón.

Las proteínas de fusión ActRIIB-Fc también se expresaron en células HEK293 y células COS. Aunque el material de  
 todas las estirpes celulares y las condiciones de cultivo razonables proporcionaron proteína con actividad de formación  
 15 de músculo *in vivo*, se observó variabilidad en la potencia relacionada, quizás, con la selección de la estirpe 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 como proteínas de fusión solubles entre ActRIIB extracelular y un dominio Fc. La fusión ActRIIB-Fc de base  
 20 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 29.

Se introdujeron diversas mutaciones, que incluyen truncamientos amino- y carboxiterminales, en la proteína ActRIIB-  
 Fc de base. En base a los datos presentados en el Ejemplo 1, se espera que estas construcciones, si se expresan  
 con una secuencia líder de TPA, carezcan de la serina aminoterminal. Las mutaciones se generaron en el dominio  
 25 extracelular de ActRIIB mediante mutagénesis por PCR. Después de la PCR, los fragmentos se purificaron a través  
 de una columna Qiagen, se digirieron con SfoI y AgeI y se purificaron con gel. Estos fragmentos se ligaron al vector  
 de expresión pAID4 (véase el documento WO2006/012627) de tal manera que, tras la ligadura, se creó una quimera  
 de fusión con IgG1 humana. Tras la transformación en DH5 alfa de E. coli, se recogieron las colonias y se aislaron los  
 ADN. Para las construcciones murinas (mFc), se sustituyó una IgG2a murina por la IgG1 humana. Se verificaron las  
 30 secuencias de todos los mutantes.

Todos los mutantes se produjeron en células HEK293T mediante transfección transitoria. En resumen, en una  
 centrifugadora de 500 ml, las células HEK293T se ajustaron a  $6 \times 10^5$  células/ml en medio Freestyle (Invitrogen) en  
 un volumen de 250 ml y se hicieron crecer durante la noche. Al día siguiente, estas células se trataron con complejo  
 35 de ADN:PEI (1:1) a concentración final de ADN de 0,5 ug/ml. Después de 4 horas, se añadieron 250 ml de medio y  
 las células se hicieron crecer durante 7 días. El medio acondicionado se recogió centrifugando las células y se  
 concentró.

Los mutantes se purificaron usando un abanico de técnicas, que incluyen, por ejemplo, una columna de proteína A, y  
 40 se eluyeron con tampón de glicina de pH bajo (3,0). Después de la neutralización, estos se dializaron contra PBS.

También se produjeron mutantes en células CHO mediante metodología similar. Los mutantes se ensayaron en  
 ensayos de unión y/o bioensayos descritos en los documentos WO 2008/097541 y WO 2006/012627. En algunos  
 aspectos, los ensayos se realizaron con medio acondicionado en lugar de proteínas purificadas. Las variaciones  
 45 adicionales de ActRIIB se describen en la patente de los EE. UU. n.º 7 842 663.

#### **Ejemplo 8. ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis en primates no humanos**

Se asignaron monos cangrejeros a siete grupos (6/sexo/grupo) y se les administró ActRIIB(20-134)-hFc como una  
 50 inyección subcutánea en dosis de 0,6, 3 o 15 mg/kg cada 2 semanas o cada 4 semanas durante un período de 9  
 meses. El grupo de control (6/sexo/grupo) recibió el vehículo al mismo volumen de dosis (0,5 ml/kg/dosis) que los  
 animales tratados con ActRIIB(20-134)-hFc. Los animales se examinaron para detectar cambios en los parámetros  
 patológicos clínicos generales (p. ej., hematología, bioquímica clínica, coagulación y análisis de orina). Los parámetros



de hematología, coagulación y bioquímica clínica (que incluye los parámetros de hierro, lipasa y amilasa) se evaluaron dos veces antes del inicio de la administración y en los Días 59, 143, 199, 227 y los Días 267 (para grupos con administración cada 4 semanas) o 281 (para grupos con administración cada 2 semanas). Las evaluaciones de los Días 267/281 se realizaron 2 semanas después de que se administrara la dosis final.

5 La administración de ActRIIB(20-134)-hFc dio como resultado cambios no adversos relacionados con la dosis en los parámetros hematológicos en macacos macho y hembra. Estos cambios incluyeron recuento de glóbulos rojos, recuento de reticulocitos y ancho de la distribución de glóbulos rojos aumentados y volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y recuento de plaquetas reducidos. En los machos, el recuento de RBC aumentó en  
10 todos los niveles de dosis, y la magnitud del aumento fue generalmente comparable si ActRIIB(20-134)-hFc se administraba cada 2 semanas o cada 4 semanas. El recuento de RBC aumentó en todos los intervalos temporales entre los Días 59 y 267/281 (a excepción de que el recuento de RBC no aumentó en los machos del grupo 2 [0,6 mg/kg cada 2 semanas] en el Día 281). En las hembras, el recuento de RBC aumentó a  $\geq 3$  mg/kg cada 2 semanas y los cambios se produjeron entre los Días 143 y 281; a 15 mg/kg cada 4 semanas, el recuento medio de RBC aumentó  
15 entre los Días 59 y 267.

Estos efectos son compatibles con un efecto positivo de ActRIIB(20-134)-hFc sobre la estimulación de la eritropoyesis.

### **Ejemplo 9. Generación de una trampa de GDF**

20 Los solicitantes construyeron una trampa de GDF como se indica a continuación. Un polipéptido que tiene un dominio extracelular de ActRIIB modificado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 1 con una sustitución L79D) con unión a la activina A muy reducida con respecto al GDF11 y/o la miostatina (como consecuencia de una sustitución leucina a aspartato en la posición 79 de la SEQ ID NO: 1) se fusionó a un dominio Fc de humano o de ratón con un enlazador  
25 mínimo (tres aminoácidos de glicina) intermedio. Las construcciones se denominan ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Las formas alternativas con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 se comportaron de manera similar (L79E). Las formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a la SEQ ID NO: 36, a continuación, también se generaron y se comportaron de forma equivalente en todos los aspectos ensayados. El aspartato en la posición 79 (con respecto a la SEQ ID NO:  
30 1, o la posición 60 con respecto a la SEQ ID NO: 36) se indica con subrayado doble a continuación. La valina en la posición 226 con respecto a la SEQ ID NO: 36 también se indica mediante subrayado doble a continuación.

La trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc se muestra a continuación como purificada a partir de estirpes de células CHO (SEQ ID NO: 36).

35  
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPT  
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGO  
PENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
LSPGK

La porción derivada de ActRIIB de la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos expuesta a continuación (SEQ ID NO: 37), y esa porción se podría usar como un monómero o como una proteína que no es de fusión a Fc  
40 como un monómero, dímero o un complejo de orden superior.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPT  
APT (SEQ ID NO: 37)

La proteína de trampa de GDF se expresó en estirpes de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder  
45 diferentes:

- (i) melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 23)
- (ii) activador del plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 24)
- (iii) natural: MTAPWVALALLWGSCLCAGS (SEQ ID NO: 30).

50



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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE  
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE  
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:38)

5 Este polipéptido es codificado por la secuencia de ácido nucleico siguiente (SEQ ID NO:39):

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  
 CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT  
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG  
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC  
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG  
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG  
 TCCCCATCGA GAAAACCATC TCAAAGCCA 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

10

La purificación se podría conseguir mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía en columna de proteína A, cromatografía en columna de Q Sepharose, cromatografía en columna de fenilsefaroza, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con filtración vírica e intercambio de tampón. En un ejemplo de un esquema de purificación, el medio de cultivo celular se hace pasar sobre una columna de proteína A, se lava en Tris/NaCl 150 mM (pH 8,0), a continuación, se lava en Tris/NaCl 50 mM (pH 8,0) y se eluye con glicina 0,1 M, pH 3,0. El eluato de pH bajo se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos como una etapa de depuración vírica. El eluato se neutraliza a continuación y se hace pasar sobre una columna de intercambio

15



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. El eluato se cambia a continuación a Tris 50 mM pH 8,0, sulfato de amonio 1,1 M y se hace pasar sobre una columna de fenilsefaroza, se lava y se eluye en Tris 50 mM pH 8,0, con sulfato de amonio entre 150 y 300 mM. El eluato se dializa y se filtra para su uso.

5

Las trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la relación de unión a activina A con respecto a la unión a miostatina o GDF11) se describen en los documentos WO 2008/097541 y WO 2006/012627.

#### 10 **Ejemplo 10. Bioensayo para la transducción de señales mediada por GDF-11- y activina**

Se usó un ensayo del gen indicador A-204 para evaluar los efectos de proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF sobre la transducción de señales mediada por GDF-11 y activina A. Estirpe celular: rabdomiosarcoma humano (derivado del músculo). Vector indicador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler y col., 1998, EMBO 17: 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente en genes sensibles a TGF-beta (p. ej., 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.

15

Día 1: dividir células A-204 en placas de 48 pocillos.

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

Día 3: adición de factores (diluidos en medio + 0,1 % de BSA). Los inhibidores se deben preincubar con los factores durante 1 h antes de añadirlos a las células. Seis horas después, las células se enjuagan con PBS y se lisan.

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

ActRIIB(20-134) es un inhibidor potente de la actividad de la activina A, el GDF-8 y el GDF-11 en este ensayo. Como se describe a continuación, también se ensayaron variantes de ActRIIB en este ensayo.

30

#### **Ejemplo 11. Variantes de ActRIIB-Fc, actividad a base de células**

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF se ensayó en un ensayo a base de células como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla siguiente. Algunas variantes se ensayaron en diferentes construcciones de truncamiento carboxiterminal. Como se comentó anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos provocaron reducción de la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) presentaron una pérdida sustancial de inhibición de la activina A, a la vez que conservaron la inhibición prácticamente de tipo natural del GDF11.

40

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

Variaciones de ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1)	Actividad de inhibición del GDF-11	Actividad de inhibición de la activina
R64	20-134	+++ (aprox. $10^{-8}$ M Ki)	+++ (aprox. $10^{-8}$ M Ki)
A64	20-134	+ (aprox. $10^{-6}$ M Ki)	+ (aprox. $10^{-6}$ M Ki)
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	+++	+++



Variaciones de ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1)	Actividad de inhibición del GDF-11	Actividad de inhibición de la activina
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ Poca actividad (aproximadamente $1 \times 10^{-6}$ K <sub>i</sub> ) ++ Actividad moderada (aproximadamente $1 \times 10^{-7}$ K <sub>i</sub> ) +++ Actividad buena (de tipo natural) (aproximadamente $1 \times 10^{-8}$ K <sub>i</sub> ) ++++ Superior a la actividad de tipo natural.			

Se han evaluado diversas variantes para determinar la semivida sérica en ratas. ActRIIB(20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene una actividad en el ensayo a base de células (anterior) y en 5 ensayos *in vivo* (a continuación) que es equivalente a la molécula de tipo natural. Junto con la semivida más larga, esto significa que, a lo largo del tiempo, una variante A24N tendrá un efecto superior por unidad de proteína que la molécula de tipo natural. La variante A24N, y cualquiera de las otras variantes ensayadas anteriormente, se puede combinar con las moléculas de trampa de GDF, tales como las variantes L79D o L79E.

#### 10 Ejemplo 12. Unión a GDF-11 y activina A

Se ensayó la unión de ciertas proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF a ligandos en un ensayo BiaCore™.

Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína de tipo natural se capturaron en el sistema usando un anticuerpo anti-hFc.

15 Los ligandos se inyectaron y fluyeron sobre las proteínas de receptor capturadas. Los resultados se resumen en las tablas siguientes.

#### Especificidad de unión a ligando de variantes de IIB.

	GDF11		
Proteína	Kas (1/Ms)	Kdis (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	Kas (1/Ms)	Kdis (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		



	GDF11		
Proteína	Kas (1/Ms)	Kdis (1/s)	KD (M)
Proteína	Kas (1/Ms)	Kdis (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 exento de células confirman los datos del ensayo a base de células, lo que demuestra que la variante A24N conserva una actividad de unión a ligando que es similar a la de la molécula de ActRIIB(20-134)-hFc y que la molécula L79D o L79E conserva la unión a miostatina y GDF11, pero presenta una unión a activina A considerablemente reducida (no cuantificable).

Se han generado y ensayado otras variantes, como se describe en el documento WO2006/012627. Véanse, p. ej., las páginas 59-60, usando ligandos acoplados al dispositivo y receptor de flujo sobre los ligandos acoplados. Notablemente, K74Y, K74F, K74I (y presumiblemente otras sustituciones hidrófobas en K74, tales como K74L) y D80I provocan una reducción en la relación de unión a activina A a unión a GDF11, con respecto a la molécula K74 de tipo natural. A continuación, se reproduce una tabla de datos relativos a estas variantes:

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

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD = 1,8e-7 M (+)	KD = 2,6e-7 M (+)
WT (64R)	na	KD = 8,6e-8 M (+++)
+15cola	KD ~2,6e-8 M (+++)	KD = 1,9e-8 M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD = 4,35e-9 M	KD = 5,3e-9 M (+)
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*



ActRIIB	ActA	GDF11
D80I	*	-
F82A	++	-
* No se observó unión -- <1/5 de la unión de WT - ~1/2 de la unión de WT + WT ++ <unión aumentada 2x +++ ~unión aumentada 5x ++++ ~unión aumentada 10x +++++ ~unión aumentada 40x.		

### Ejemplo 13: Una trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

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

#### 10 Designación de los grupos

Grupo	N	Ratones	Inyección	Dosis (mg/kg)	Vía	Frecuencia
1	10	C57BL/6	PBS	0	s.c.	Dos veces/semana
2	10	C57BL/6	Trampa de GDF [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]	10	s.c.	Dos veces/semana

El tratamiento con la trampa de GDF no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el número de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles de vehículo. Los números de glóbulos rojos (RBC) aumentaron en el grupo tratado con respecto a los controles (véase la tabla a continuación). Tanto el contenido de hemoglobina (HGB) como el hematocrito (HCT) también aumentaron debido a los glóbulos rojos adicionales. La anchura promedio de los glóbulos rojos (RDWc) fue superior en los animales tratados, lo que indica un aumento en el grupo de glóbulos rojos inmaduros. Por lo tanto, el tratamiento con la trampa de GDF conduce a aumentos en los glóbulos rojos, sin efectos distinguibles en las poblaciones de glóbulos blancos.

#### Resultados de hematología

	RBC 10 <sup>12</sup> /L	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10,7 ± 0,1	14,8 ± 0,6	44,8 ± 0,4	17,0 ± 0,1
Trampa de GDF	12,4 ± 0,4**	17,0 ± 0,7*	48,8 ± 1,8*	18,4 ± 0,2**
* = p < 0,05, ** = p < 0,01				

### Ejemplo 14: Una trampa de GDF es superior a ActRIIB-Fc para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

Se asignaron aleatoriamente ratones C57BL/6NTac macho de diecinueve semanas de edad a uno de tres grupos de tratamiento. Se administró a los ratones vehículo (solución salina tamponada con Tris 10 mM, TBS), ActRIIB(20-134)-mFc de tipo natural o ActRIIB(L79D 20-134)-hFc de trampa de GDF mediante inyección subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas. Se recogió sangre de la mejilla en el momento inicial y después de tres semanas de administración y se analizó para determinar la distribución celular usando un analizador de hematología (HM2, Abaxis, Inc.).

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



**Resultados hematológicos después de tres semanas de administración**

	RBC (10 <sup>12</sup> /ml)	HCT (%)	HGB (g/dL)
TBS	11,06 ± 0,46	46,78 ± 1,9	15,7 ± 0,7
ActRIIB-mFc	11,64 ± 0,09	49,03 ± 0,3	16,5 ± 1,5
Trampa de GDF	13,19 ± 0,2**	53,04 ± 0,8**	18,4 ± 0,3**
**= p < 0,01			

**5 Ejemplo 15: Generación de una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado**

Como se describió en el Ejemplo 9, se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB(L79D 20-134)-hFc mediante fusión aminoterminal de secuencia líder de TPA al dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 de la SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 de la SEQ ID NO: 1) y fusión carboxiterminal de dominio Fc humano con enlazador mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 16). Una secuencia de nucleótidos que corresponde a esta proteína de fusión se muestra en la Figura 17.

Se generó una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado, denominada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, mediante fusión aminoterminal de secuencia líder de TPA al dominio extracelular truncado (residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 de la SEQ ID NO: 1) y fusión carboxiterminal de dominio Fc humano con enlazador mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 18). Una secuencia de nucleótidos que corresponde a esta proteína de fusión se muestra en la Figura 19.

**20 Ejemplo 16: Unión selectiva a ligando por trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB doblemente truncado**

La afinidad de las trampas de GDF y otras proteínas ActRIIB-hFc por varios ligandos se evaluó con un instrumento Biacore™ *in vitro*. Los resultados se resumen en la tabla siguiente. Los valores de K<sub>d</sub> se obtuvieron mediante ajuste de afinidad en situación de equilibrio debido a la asociación y disociación muy rápidas del complejo, lo que impidió la determinación exacta de K<sub>as</sub> y K<sub>dis</sub>.

**Selectividad de ligando de 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 de ligando presentada por la variante más larga, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, con pérdida pronunciada de la unión a activina A, pérdida parcial de la unión a activina B y conservación prácticamente total de la unión a GDF11 en comparación con los equivalentes de ActRIIB-hFc que carecen de la sustitución L79D. Cabe señalar que el truncamiento solo (sin sustitución L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos mostrados aquí [comparar ActRIIB(L79 25-131)-hFc con ActRIIB(L79 20-134)-hFc].

**Ejemplo 17: Generación de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc con secuencias de nucleótidos alternativas**

Para generar ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, el dominio extracelular de ActRIIB humano con una sustitución de aspartato en la posición natural 79 (SEQ ID NO: 1) y con truncamientos aminoterminales y carboxiterminales (residuos 25-131 de la SEQ ID NO: 1) se fusionó aminoterminalmente con una secuencia líder de TPA en lugar de la secuencia líder de ActRIIB natural y carboxiterminalmente con un dominio Fc humano a través de un enlazador mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 18). Una secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína de fusión se muestra en la Figura 19 (SEQ ID NO: 42), y una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente la misma proteína de fusión se muestra en la Figura 22 (SEQ ID NO: 46). Esta proteína se expresó y se purificó usando la metodología descrita en el Ejemplo 9.



**Ejemplo 18: Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta la proliferación de progenitores eritroides en ratones**

Se evaluó ActRIIB(L79D 25-131)-hFc para determinar su efecto sobre la proliferación de progenitores eritroides. Se trataron ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 6) o vehículo (TBS; n = 6) en los Días 1 y 4, a continuación se sometieron a eutanasia en el Día 8 para la recogida de bazo, tibias, fémures y sangre. Se aislaron células del bazo y la médula ósea, se diluyeron en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía 5 % de suero bovino fetal, se suspendieron en medio a base de metilcelulosa especializado y se cultivaron durante 2 o 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en las etapas de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) y unidades generadoras de explosión eritroide (BFU-E), respectivamente. El medio a base de metilcelulosa para la determinación de BFU-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluía factor de células madre murinas recombinante, interleucina-3 e interleucina-6, que no estaban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de CFU-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), mientras que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros constituyentes. Tanto para BFU-E como para CFU-E, el número de colonias se determinó en placas de cultivo por duplicado derivadas de cada muestra de tejido, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

Los cultivos derivados del bazo de ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc tuvieron el doble de colonias CFU-E que los cultivos correspondientes de ratones de control ( $p < 0,05$ ), mientras que el número de colonias BFU-E no varió significativamente con el tratamiento *in vivo*. El número de colonias CFU-E o BFU-E de los cultivos de médula ósea tampoco varió significativamente con el tratamiento. Como se esperaba, los números aumentados de colonias CFU-E en cultivos derivados del bazo estuvieron acompañados de cambios muy significativos ( $p < 0,001$ ) en el nivel de glóbulos rojos (aumento de 11,6 %), la concentración de hemoglobina (aumento de 12 %) y el nivel de hematocrito (aumento de 11,6 %) en el momento de la eutanasia en los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración *in vivo* de una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto general para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

Se ha demostrado además que las proteínas de fusión de trampa de GDF son efectivas para aumentar los niveles de glóbulos rojos en diversos modelos de anemia que incluyen, por ejemplo, anemia inducida por quimioterapia, anemia inducida por nefrectomía y anemia por pérdida de sangre (véase, p. ej., la solicitud de patente de los EE. UU. n.º WO 2010/019261).

**Ejemplo 19: Una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos**

Se evaluaron dos trampas de GDF, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, para determinar su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos en macacos cangrejeros. Los macacos se trataron por vía subcutánea con trampa de GDF (10 mg/kg; n = 4 machos/4 hembras) o vehículo (n = 2 machos/2 hembras) en los Días 1 y 8. Se recogieron muestras de sangre en los Días 1 (valor inicial antes del tratamiento), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron para determinar los niveles de glóbulos rojos (Figura 24), el hematocrito (Figura 25), los niveles de hemoglobina (Figura 26) y los niveles de reticulocitos (Figura 27). Los macacos tratados con vehículo presentaron niveles reducidos de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en todos los intervalos temporales posteriores al tratamiento, un efecto esperado del muestreo de sangre repetido. En cambio, el tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó estos parámetros en el primer intervalo temporal posterior al tratamiento (Día 3) y los mantuvo a niveles sustancialmente elevados durante toda la duración del estudio (Figuras 24-26). Es importante destacar que los niveles de reticulocitos en los macacos tratados con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentaron sustancialmente en los Días 8, 15 y 29 en comparación con el vehículo (Figura 27). Este resultado demuestra que el tratamiento con trampa de GDF aumentó la producción de precursores de glóbulos rojos, lo que da como resultado niveles elevados de glóbulos rojos.

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

**Ejemplo 20: Trampa de GDF derivada de ActRIIB5**

Otros han descrito una forma soluble de ActRIIB alternativa (denominada ActRIIB5), en la que el exón 4, que incluye el dominio transmembranario de ActRIIB, se ha sustituido por una secuencia carboxiterminal diferente (véase, p. ej., el documento WO 2007/053775).

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



GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
 KGCWLD~~DD~~FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
 TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE (SEQ ID NO:49)

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

5

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
 KGCW~~DD~~DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
 TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE (SEQ ID NO:50)

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

10

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
 KGCWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
 TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTL  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:51).

Esta construcción se puede expresar en células CHO.

#### 15 **Ejemplo 21: Efectos en ratones de la politerapia con EPO y una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado**

La EPO induce la formación de glóbulos rojos aumentando la proliferación de precursores eritroides, mientras que las trampas de GDF podrían influir potencialmente en la formación de glóbulos rojos de maneras que complementan o mejoran los efectos de la EPO. Por lo tanto, los solicitantes investigaron el efecto de la politerapia con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los parámetros eritropoyéticos. Se administró a ratones C57BL/6 macho (9 semanas de edad) una única inyección i.p. de EPO humana recombinante sola (epoetina alfa, 1800 unidades/kg), ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sola (10 mg/kg), tanto EPO como ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, o vehículo (solución salina tamponada con Tris). Los ratones se sometieron a eutanasia 72 h después de la administración para la recogida de sangre, bazo y fémures.

Los bazo y fémures se procesaron para obtener células precursoras de eritroides para análisis de citometría de flujo. Después de la retirada, el bazo se trocó en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía 5 % de suero bovino fetal y se disoció mecánicamente empujando a través de un separador de células de 70 µm con el émbolo de una jeringa estéril de 1 mL. Se limpiaron los fémures de cualquier músculo o tejido conjuntivo residual y se recortaron los extremos para permitir la recogida de médula lavando el eje restante con medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía 5 % de suero fetal bovino a través de una aguja de calibre 21 conectada a una jeringa de 3 mL. Las suspensiones celulares se centrifugaron (2000 rpm durante 10 min) y los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS que contenía 5 % de suero fetal bovino. Se incubaron células (10<sup>6</sup>) de cada tejido con IgG anti-ratón para bloquear la unión inespecífica, a continuación se incubaron con anticuerpos marcados fluorescentemente contra marcadores de ratón de la superficie celular CD71 (receptor de transferrina) y Ter119 (un antígeno asociado a la glicoforina A de la superficie celular), se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células muertas de las muestras se excluyeron del análisis contratiñendo con yoduro de propidio. La diferenciación eritroide en el bazo o la médula ósea se evaluó mediante el grado de marcado de CD71, que disminuye durante el transcurso de la diferenciación, y de marcado de Ter119, que aumenta durante la diferenciación eritroide terminal que comienza con la etapa de proeritroblastos (Socolovsky y col., 2001, Blood 98:3261-3273; Ying y col., 2006, Blood 108:123-133). Por tanto, la citometría de flujo se usó para determinar el número de proeritroblastos (CD71<sup>alt</sup>Ter119<sup>baj</sup>), eritroblastos basófilos (CD71<sup>alt</sup>Ter119<sup>alt</sup>), eritroblastos policromatófilos + ortocromatófilos (CD71<sup>med</sup>Ter119<sup>alt</sup>) y eritroblastos ortocromatófilos + reticulocitos tardíos (CD71<sup>baj</sup>Ter119<sup>alt</sup>), como se describe.

45

La politerapia con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc condujo a un aumento sorprendentemente enérgico en los



glóbulos rojos. En el plazo de 72 horas de este experimento, ni la EPO ni ActRIIB(L79D 25-131)-hFc solas aumentaron significativamente el hematocrito en comparación con el vehículo, mientras que la politerapia con los dos agentes condujo a un aumento de prácticamente 25 % en el hematocrito que fue inesperadamente sinérgico, es decir, superior a la suma de sus efectos individuales (Figura 28). La sinergia de este tipo generalmente se considera un signo de que los agentes individuales están actuando a través de mecanismos celulares diferentes. También se observaron resultados similares para las concentraciones de hemoglobina (Figura 29) y las concentraciones de glóbulos rojos (Figura 30), cada una de las cuales también aumentó sinérgicamente mediante la politerapia.

El análisis de los niveles de precursores eritroides reveló un patrón más complejo. En el ratón, el bazo se considera el órgano principal responsable de la eritropoyesis inducible ("estrés"). El análisis citométrico de flujo de tejido esplénico a las 72 h reveló que la EPO alteraba considerablemente el perfil de los precursores eritropoyéticos en comparación con el vehículo, aumentando el número de eritroblastos basófilos en más de 170 % a expensas de los precursores tardíos (eritroblastos ortocromatófilos + reticulocitos tardíos), que disminuyeron en más de un tercio (Figura 31). Cabe destacar que la politerapia aumentó los eritroblastos basófilos significativamente en comparación con el vehículo, pero en menor medida que la EPO sola, a la vez que mantuvo la maduración no reducida de precursores tardíos (Figura 31). Por tanto, la politerapia con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó la eritropoyesis mediante una mejora equilibrada de la proliferación y maduración de precursores. Al contrario que el bazo, el perfil de células precursoras en la médula ósea después de la politerapia no varió apreciablemente del de después de la EPO sola. Los solicitantes predicen a partir del perfil de precursores esplénicos que la politerapia conduciría a niveles de reticulocitos aumentados y vendrían acompañados de elevación mantenida de los niveles de glóbulos rojos maduros si el experimento se prolongara más de 72 h.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que se puede administrar una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado en combinación con EPO para aumentar sinérgicamente la formación de glóbulos rojos in vivo. Al actuar a través de un mecanismo complementario pero indefinido, una trampa de GDF puede moderar el efecto proliferativo fuerte de un activador del receptor de la EPO solo y seguir permitiendo que se alcancen niveles objetivo de glóbulos rojos con dosis inferiores de un activador del receptor de la EPO, lo que evita de ese modo potenciales efectos adversos u otros problemas asociados a niveles superiores de activación del receptor de la EPO.

#### **Ejemplo 22: Una trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos y mejora la morfología de los glóbulos rojos en un modelo de drepanocitosis**

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre la formación de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de ratón de drepanocitosis (SCD) en el que los genes de hemoglobina de ratón ( $\alpha/\alpha$  y  $\beta/\beta$ ) se han sustituido por los genes de hemoglobina falciforme humana ( $\alpha/\alpha$ ,  $\gamma/\gamma$  y  $\beta^S/\beta^S$ ). Los ratones homocigóticos para el alelo  $\beta^S$  humano presentan las características principales (p. ej., anemia hemolítica grave, glóbulos rojos irreversiblemente falciformes, (vaso)oclusión vascular y patología multiorgánica) encontradas en seres humanos con drepanocitosis [véase, p. ej., Wu y col., (2006) Blood, 108(4): 1183-1188; Ryan y col. (1997) Science 278: 873-876].

Se asignaron aleatoriamente ratones con SCD ( $\beta^S/\beta^S$ ) de 3 meses de edad para recibir ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (1 mg/kg o 10 mg/kg) o vehículo [solución salina tamponada con Tris (TBS)] mediante inyecciones subcutáneas dos veces a la semana. Los compañeros de camada ( $\beta/\beta$ ) heterocigotos compuestos no sintomáticos a los que se les administró vehículo sirvieron como controles adicionales (animales Wt). En el momento inicial, los ratones con SCD tenían niveles de RBC reducidos (-28 %,  $p < 0.01$ ) y niveles de hemoglobina (-14,5 %,  $p < 0.05$ ) y niveles de reticulocitos (+50 %,  $p < 0.001$ ) aumentados en comparación con los ratones heterocigotos compuestos, lo que demuestra que los ratones con SCD estaban gravemente anémicos.

Después de un mes de tratamiento, los sujetos fueron evaluados para detectar cambios en diversos parámetros de los glóbulos rojos. El tratamiento de ratones con SCD con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante cuatro semanas (1 mg/kg) aumentó los niveles de RBC considerablemente (+15,2 %,  $p < 0.01$ ) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo, reduciendo de ese modo la anemia observada en este modelo (Figuras 32 y 33). También se observaron aumentos asociados al tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc en las concentraciones de hematocrito y hemoglobina (Figura 33), así como reducciones significativas en el volumen corpuscular medio, el ancho de la distribución de RDC, los números de reticulocitos y las especies reactivas del oxígeno (Figura 34), que son todos compatibles con una semivida de los glóbulos rojos mejorada. Sorprendentemente, el tratamiento de ratones con SCD con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 6 semanas (1 mg/kg) dio como resultado una reducción sustancial de la exposición a fosfatidilserina (PS) en las células sanguíneas periféricas (-14 %,  $p = 0.08$ ), como se determina mediante ensayo de la enzima escramblasa y ensayo de anexina-V, lo que indica una tendencia a asimetría de los fosfolípidos de la membrana mejorada en comparación con los sujetos tratados con vehículo.

Después de tres meses de tratamiento, se observó que los sujetos presentaban mejoras en parámetros del análisis bioquímico de la sangre adicionales. En particular, el tratamiento de ratones con SCD con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 12 semanas (1 mg/kg) redujo significativamente los niveles (totales) de bilirrubina (-17,0 %,  $p < 0.05$ ), los niveles de nitrógeno ureico en la sangre (-19,2 %,  $p < 0.05$ ) y la hemoglobina libre en las células (-30,7 %,  $p = 0.06$ ) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Estos datos indican que los sujetos tratados con



trampa de GDF tienen niveles reducidos de hemólisis de los glóbulos rojos en comparación con los sujetos tratados con vehículo, lo cual es compatible con el aumento de los niveles de glóbulos rojos observado tan pronto como un mes después del inicio de la terapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc. Los ensayos de anexina-V demostraron una reducción significativa de la exposición a fosfatidilserina (PS) en las células sanguíneas periféricas (-13,4 %,  $p = 0,06$ ) después de tres meses de terapia en comparación con los sujetos tratados con vehículo. Asimismo, las extensiones sanguíneas realizadas después de tres meses de tratamiento (1 mg/kg) presentaron menos glóbulos rojos irreversiblemente falciformes en los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (-66,5 %,  $p < 0,0001$ ; contados a partir de aproximadamente 2000 células por grupo) en comparación con los ratones tratados solo con vehículo. Estos datos indican una mejora cualitativa en la morfología de los glóbulos rojos después del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc, que es compatible con los datos del ensayo de la enzima escramblasa y del ensayo de anexina-V obtenidos después de uno y tres meses de tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc. Asimismo, el tratamiento de ratones con SCD con la trampa de GDF durante 3 meses (1 mg/kg) también dio como resultado una reducción significativa en el peso del bazo (-20,5 %,  $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Estos datos indican que ActRIIB(L79D 25-131)-mFc puede ser útil en el tratamiento de otras complicaciones asociadas a la drepanocitosis que incluyen, por ejemplo, el secuestro esplénico de glóbulos rojos, que puede dar como resultado una crisis de secuestro esplénico y/o esplenomegalia.

La hemólisis y falciformación de los glóbulos rojos en pacientes con SCD dan como resultado anemia y transporte de oxígeno reducido a diversos tejidos. Tales condiciones hipóxicas a menudo dan como resultado congestión vascular, lesión y necrosis que, en última instancia, pueden conducir a lesión de los órganos afectados en pacientes con SCD. Durante el transcurso de este estudio, se observó que ActRIIB(L79D 25-131)-mFc mejora significativamente la capacidad de transportar oxígeno de la hemoglobina e impide la lesión de órganos afectados en ratones con SCD.

Después de seis semanas de terapia [10 mg/kg de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc, s.c., dos veces a la semana], los ratones con SCD tratados con trampa de GDF presentaban niveles de hemoglobina aumentados (+18,4 %,  $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Las muestras de sangre se evaluaron además para detectar diferencias en las propiedades de transporte de oxígeno de la hemoglobina. Se observó que los ratones con SCD tratados con trampa de GDF presentan niveles de saturación de oxihemoglobina ( $O_2Hb$ ) aumentados (+41,3 %,  $p = 0,06$ ) y niveles de saturación de carboxihemoglobina ( $COHb$ ) reducidos (-25,2 %,  $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Asimismo, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg) dio como resultado un contenido de oxígeno en la sangre ( $O_2Ct$ ) y una saturación ( $SO_2$ ) aumentados en comparación con los sujetos de control (+65,2 %,  $p = 0,05$ ,  $O_2Ct$ ; +40,9 %,  $p = 0,06$ ,  $SO_2$ ). En base a estas mediciones, se determinó que la capacidad de transportar oxígeno de la hemoglobina ( $O_2Cap$ ) de los ratones con SCD tratados con trampa de GDF es significativamente superior (+14,04 %,  $p < 0,05$ ) a la de los ratones tratados con vehículo. Por tanto, estos datos indican que la terapia con antagonistas de ActRII se puede usar para mejorar la oxigenación de tejidos/órganos en pacientes con SCD.

Además de la capacidad de transportar oxígeno, se evaluó la lesión en órganos afectados en ratones con SCD tratados con trampa de GDF [10 mg/kg de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc, s.c., dos veces a la semana] y con vehículo. El análisis histológico de los ratones tratados con trampa de GDF demostró una reducción sustancial de la congestión vascular y la lesión en bazo y riñones (se muestra la unión corticomedular) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Véase la Figura 35. Además, se demostró que el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc reduce el engrosamiento alveolar en los pulmones. Véanse las flechas negras de la Figura 35. Estos resultados son compatibles con la falciformación de glóbulos rojos reducida y la capacidad de transportar oxígeno aumentada observadas en ratones con SCD tratados con trampa de GDF. Por consiguiente, los datos indican que los antagonistas de ActRII se pueden usar para tratar o impedir la lesión de órganos afectados en pacientes con SCD.

Los solicitantes han demostrado que una trampa GDF que comprende un dominio extracelular de ActRIIB puede proporcionar diversos beneficios terapéuticos en un modelo murino de SCD. Además de aumentar los niveles de RBC y mejorar diversos parámetros sanguíneos (p. ej., capacidad de transportar oxígeno aumentada), la terapia con trampa de GDF mejoró la morfología de los RBC (es decir, redujo los números de células falciformes), redujo el agrandamiento del bazo y redujo la lesión de órganos afectados en pacientes con SCD. Por consiguiente, los datos presentados en esta solicitud indican que los antagonistas de ActRII (p. ej., polipéptidos de trampa de GDF) se pueden usar para tratar la anemia, así como complicaciones de la drepanocitosis distintas de la anemia (p. ej., complicaciones derivadas de la vasooclusión). Asimismo, a diferencia de las transfusiones de glóbulos rojos, que son inherentemente una fuente de hierro exógeno, los antagonistas de ActRII (p. ej., polipéptidos de trampa de GDF) pueden elevar los niveles de RBC favoreciendo el uso de reservas de hierro endógeno a través de la eritropoyesis y, por tanto, evitar la sobrecarga de hierro y sus consecuencias negativas.

#### **Ejemplo 23: Efectos de una trampa GDF sobre el síndrome torácico agudo**

Como el síndrome torácico agudo (ACS) es una de las causas más comunes de hospitalización en pacientes con SCD, los solicitantes investigaron los efectos de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc en un modelo de ratón de ACS. Los ratones con SCD se colocaron en uno de dos grupos: tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg, dos veces a la semana, s.c.) y tratamiento con vehículo de TBS (control). Después de tres meses de tratamiento, se inyectó



hemina a los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y con vehículo para inducir hemólisis y ACS. Véase, p. ej., Samit Ghosh y col., (2013) J Clin Invest, 123 (11): 4809-4820. El pretratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc prolongó significativamente el tiempo de supervivencia (3 veces) de los ratones con SCD en comparación con el pretratamiento con vehículo. Estos datos indican que los antagonistas de ActRII (p. ej., polipéptidos de trampa de GDF) se pueden usar para reducir la hemólisis intravascular aguda y proporcionar resistencia aumentada a episodios de ACS de origen natural en pacientes con SCD.

#### **Ejemplo 24: Efectos de la politerapia con hidroxiurea y trampa de GDF en ratones con SCD**

- 10 En un estudio adicional, los solicitantes investigaron el efecto de la politerapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc e hidroxiurea (HU) en un modelo de ratón de SCD. Se colocaron ratones con SCD ( $\beta^S/\beta^S$ ) en cuatro grupos de tratamiento: i) tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg, dos veces a la semana, s.c.); ii) tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg, dos veces a la semana, s.c.) y HU (100 mg/kg, dos veces a la semana, i.p.); iii) tratamiento con HU (100 mg/kg, dos veces a la semana, i.p.); y iv) vehículo de TBS (control) durante tres meses.
- 15 Los compañeros de camada ( $\beta/\beta^S$ ) heterocigotos compuestos no sintomáticos se trataron de manera similar y se usaron como controles para confirmar la enfermedad en los ratones ( $\beta^S/\beta^S$ ) SCD. Al inicio del estudio, los ratones con SCD tenían niveles de RBC (-28 %,  $p < 0,01$ ) y niveles de hemoglobina (-14,5 %,  $p < 0,05$ ) reducidos y niveles de reticulocitos (+50 %,  $p < 0,001$ ) aumentados en comparación con los ratones heterocigotos compuestos, lo que indica hemólisis característica de la drepanocitosis. Después de un mes de tratamiento, los sujetos fueron evaluados para
- 20 detectar cambios en diversos parámetros.

Como se observó en los experimentos anteriores, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (solo) dio como resultado aumentos significativos de los niveles de glóbulos rojos (+20 %,  $p < 0,01$ ) y reducciones de los reticulocitos (-30 %,  $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones con SCD tratados con vehículo. Los datos de la politerapia con

25 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y HU demostraron efectos beneficiosos aditivos en los ratones con SCD en comparación con la monoterapia. Por ejemplo, la combinación de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y HU dio como resultado una reducción superior en la exposición a anexina V/PS en las células sanguíneas periféricas que el tratamiento con HU sola [-35,6 % ( $p < 0,001$ ) frente a -22,2 %, respectivamente, todos los datos con respecto a los ratones con SCD tratados con vehículo], lo que indica una mejora superior en la asimetría de los fosfolípidos de la membrana en los

30 ratones con SCD que recibieron la politerapia. La combinación de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc e HU también dio como resultado una reducción superior en el tamaño del bazo (-50,7 %,  $p < 0,05$ ) en comparación con la monoterapia con HU (-20,2 %,  $p < 0,05$ ) o ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (-16,4 %,  $p < 0,05$ ), todos los datos con respecto a los ratones con SCD tratados con vehículo. Estos hallazgos demuestran que la politerapia tiene un efecto superior sobre la reducción de la esplenomegalia en sujetos con SCD en comparación con la monoterapia con HU o ActRIIB(L79D 25-

35 131)-mFc. Además, se observó una reducción superior en los niveles de bilirrubina en los ratones que recibieron la politerapia (-55,0 %,  $p < 0,01$ ) en comparación con la monoterapia con HU (-48,4 %,  $p < 0,05$ ) o ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (-40,8 %,  $p < 0,05$ ), todos los datos con respecto a los ratones tratados con vehículo. Estos hallazgos demuestran que la politerapia tiene un efecto superior sobre la reducción de la hemólisis en sujetos con SCD en comparación con la monoterapia con HU o ActRIIB(L79D 25-131)-mFc. El análisis histológico demostró además una

40 reducción superior de la congestión vascular y la lesión en bazo y riñones de ratones que recibieron la politerapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y HU en comparación con los ratones que recibieron vehículo o monoterapia con HU. Véase la Figura 36. Además, el análisis histológico demostró una reducción superior del engrosamiento alveolar en los ratones que recibieron la politerapia con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc y HU en comparación con los ratones que recibieron vehículo o monoterapia con HU. Véanse las flechas negras de la Figura 36.

45 En conjunto, los datos presentados en esta solicitud demuestran que una trampa de GDF es eficaz como monoterapia, así como efectiva como parte de una politerapia con HU para mejorar la patología de la SCD. De hecho, los datos indican que se puede administrar una trampa de GDF en combinación con HU para tratar sinérgicamente la SCD.



## REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en un procedimiento para tratar o impedir una complicación de la drepanocitosis en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar la composición a un sujeto, donde la composición  
5 comprende un antagonista de ActRII, donde la complicación se selecciona del grupo que consiste en crisis de dolor, vasooclusión y crisis vasooclusiva, donde el antagonista de ActRII comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición que corresponde a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1; donde el polipéptido se une a GDF8 y/o GDF11.
- 10 2. La composición para uso según la reivindicación 1, donde la complicación es crisis de dolor.
3. La composición para uso según la reivindicación 1, donde la complicación de la drepanocitosis es crisis vasooclusiva.
- 15 4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el aminoácido ácido es un ácido glutámico o un ácido aspártico.
6. La composición para uso según la reivindicación 4, donde el aminoácido ácido es un ácido glutámico.
- 25 7. La composición para uso según la reivindicación 4, donde el aminoácido ácido es un ácido aspártico.
8. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polipéptido es:  
un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 o que comprende una secuencia  
30 de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; o  
un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.
9. La composición para uso de acuerdo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u 8, donde el  
35 polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.
10. La composición para uso de acuerdo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u 8, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.
- 40 11. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende además uno o más dominios polipeptídicos heterólogos que mejoran una o más de: semivida *in vivo*, semivida *in vitro*, administración, ubicación o distribución tisular, formación de complejos proteicos y purificación, donde el dominio polipeptídico heterólogo se selecciona de entre: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
- 45 12. La composición para uso según la reivindicación 11, donde el dominio Fc de inmunoglobulina:  
a. es un dominio Fc de IgG1; o  
b. comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 15 o 16.
- 50 13. La composición para uso según la reivindicación 11 o 12, donde la proteína de fusión comprende además un dominio de enlazador situado entre el dominio polipeptídico y el dominio Fc de inmunoglobulina.
14. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el polipéptido comprende  
55 una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico.
15. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el procedimiento  
60 comprende además administrar uno o más tratamientos complementarios para la drepanocitosis, donde el tratamiento complementario:  
a) es una transfusión con glóbulos rojos;  
b) comprende la administración de un agente quelante de hierro o múltiples agentes quelantes de hierro;  
65 c) comprende la administración de eritropoyetina, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega,



darbepoetina alfa o metoxi-polietilenglicol epoetina beta; y/o  
d) comprende la administración de hidroxiurea.

16. La composición para uso según la reivindicación 15, donde el tratamiento complementario comprende la  
5 administración de hidroxiurea.



ActRIIa	ILGRSETQEC	IFENANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRRC	FTWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYMANWELE	RTNQSGLERC	EGEQDKPLHC	YASWRNSSGT
	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVERKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPFM
	IELVKKGCWL	DDFNCLRQE	CVATEENPOV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TKKPPT			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

FIGURA 1



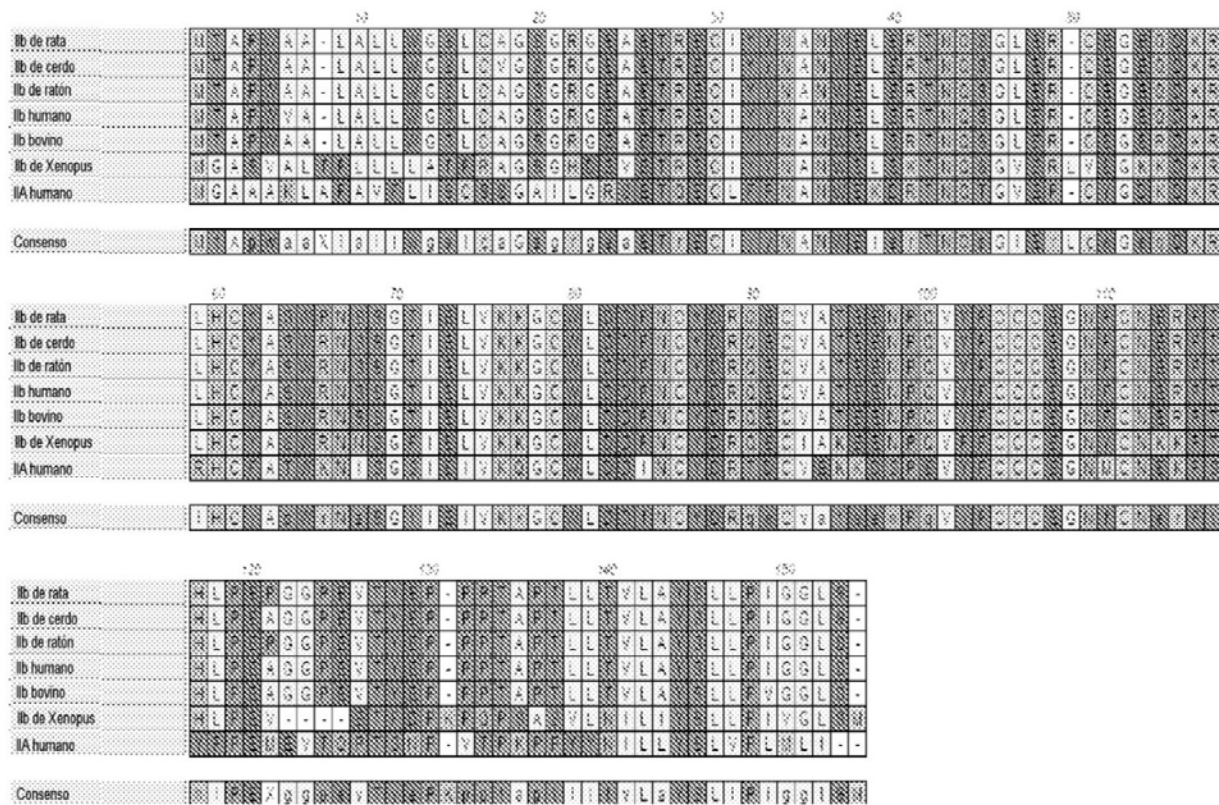


FIGURA 2



FIGURA 3A

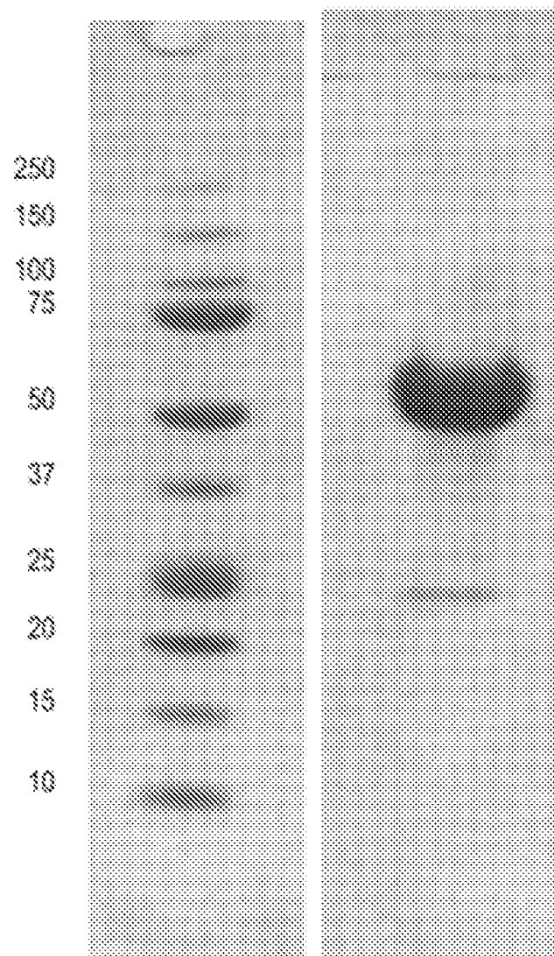
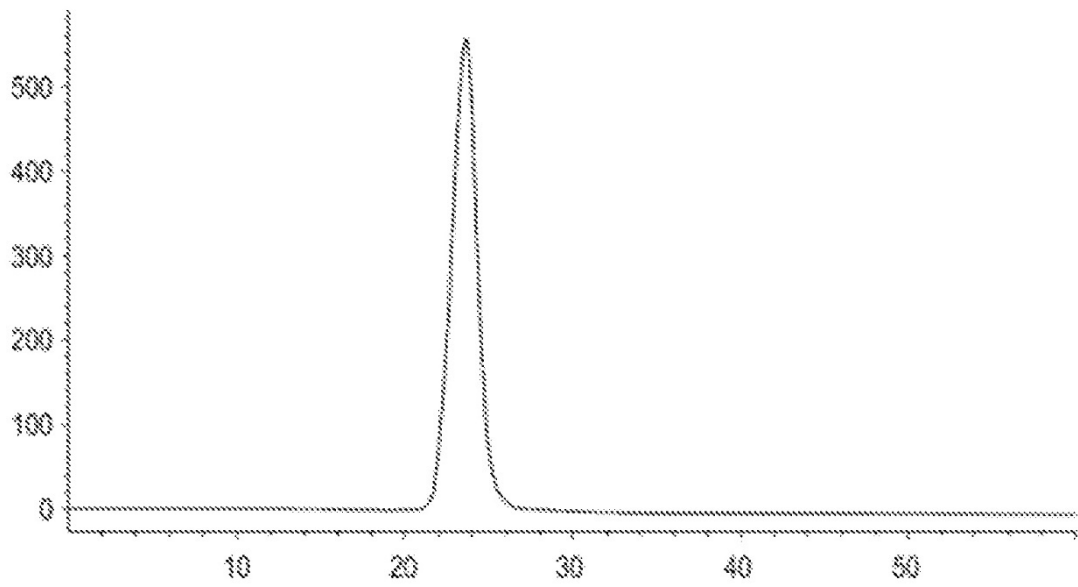


FIGURA 3B



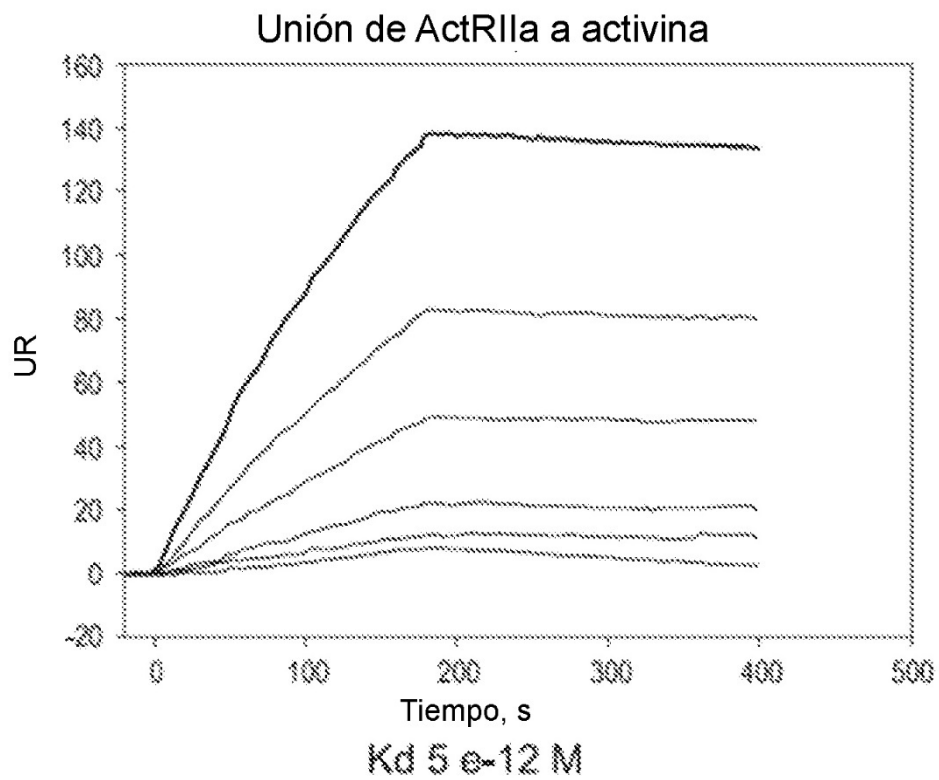


FIGURA 4A

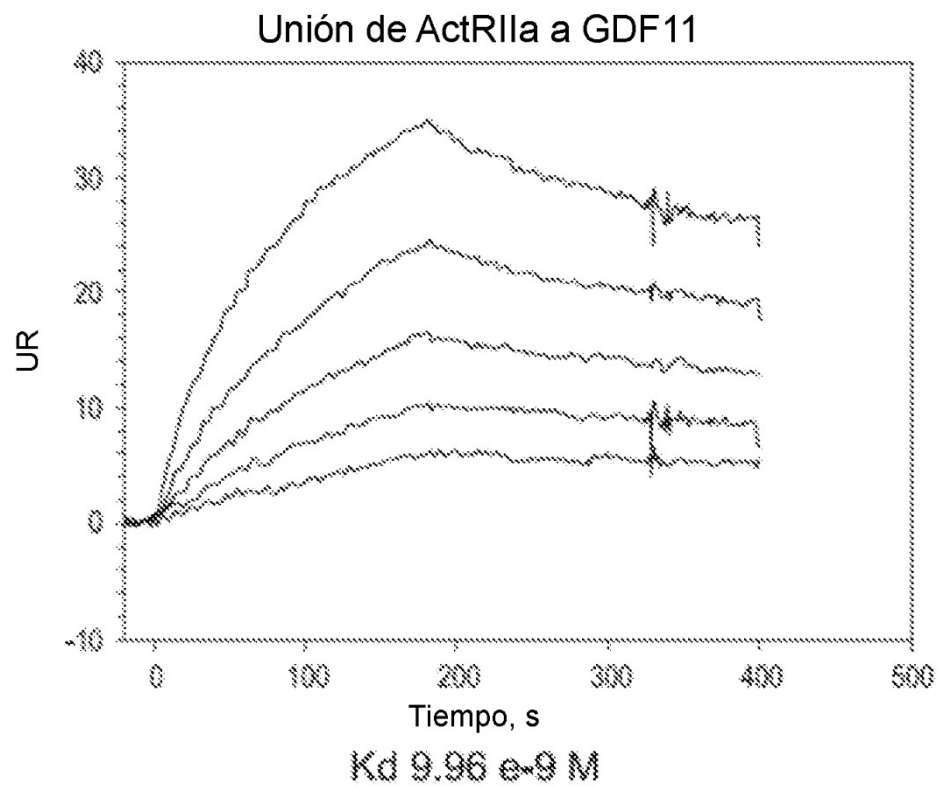


FIGURA 4B



Figura 5A

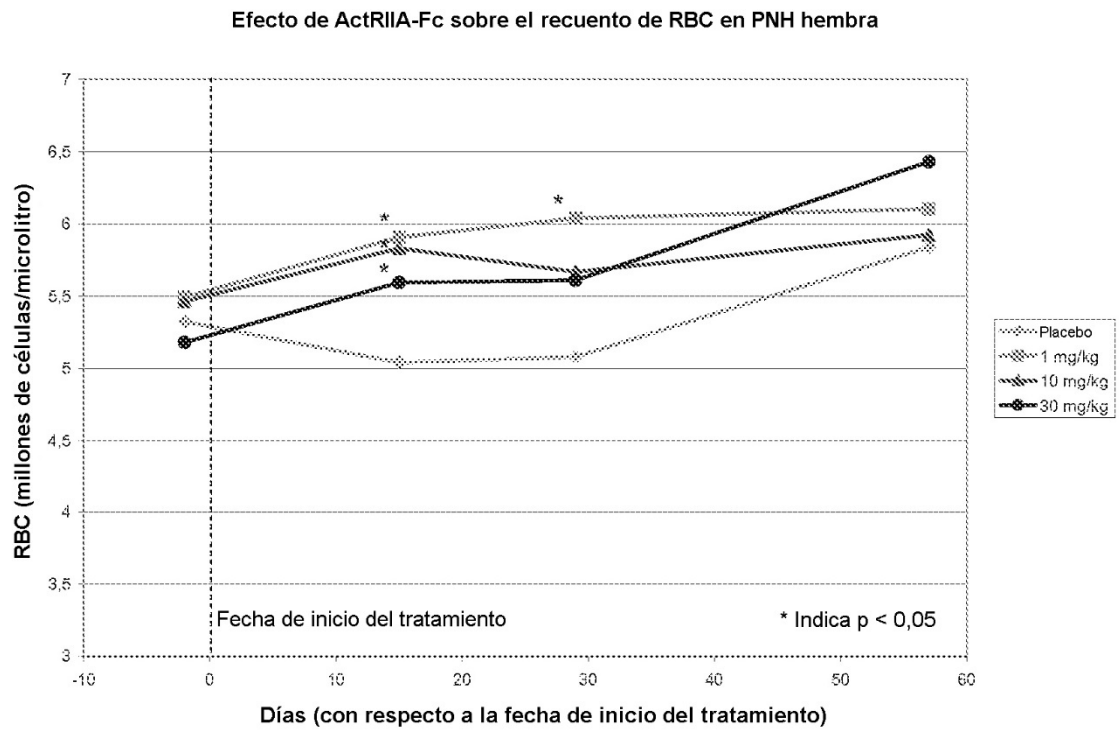


Figura 5B

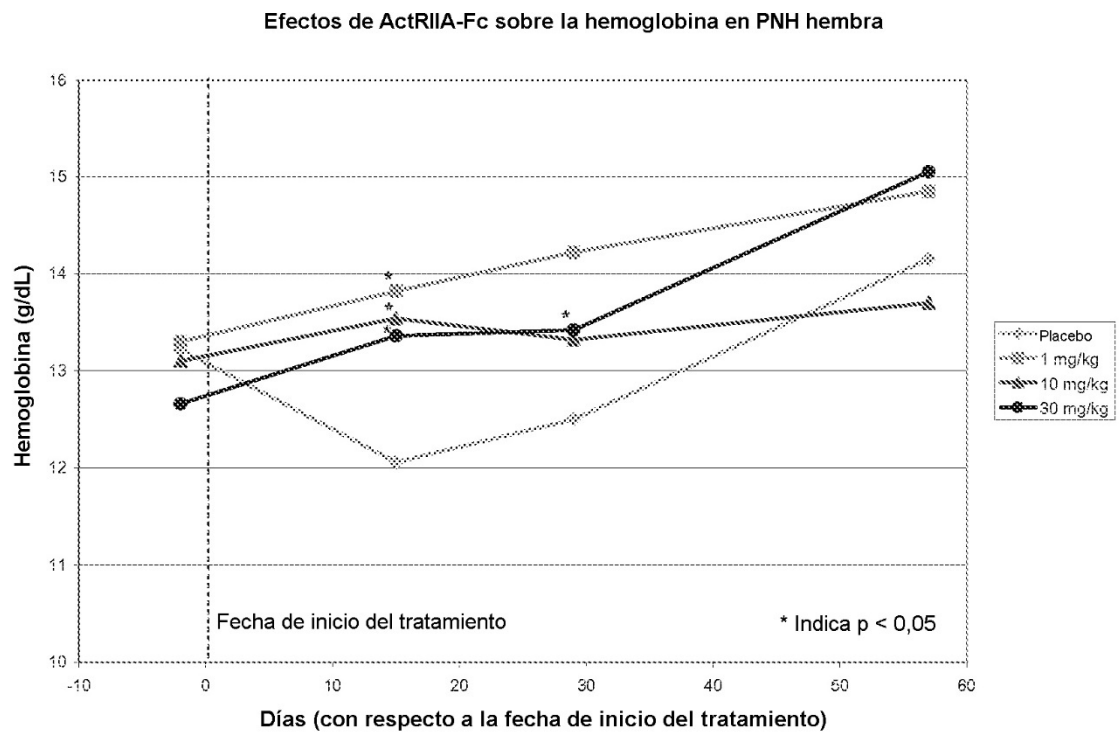




Figura 6A

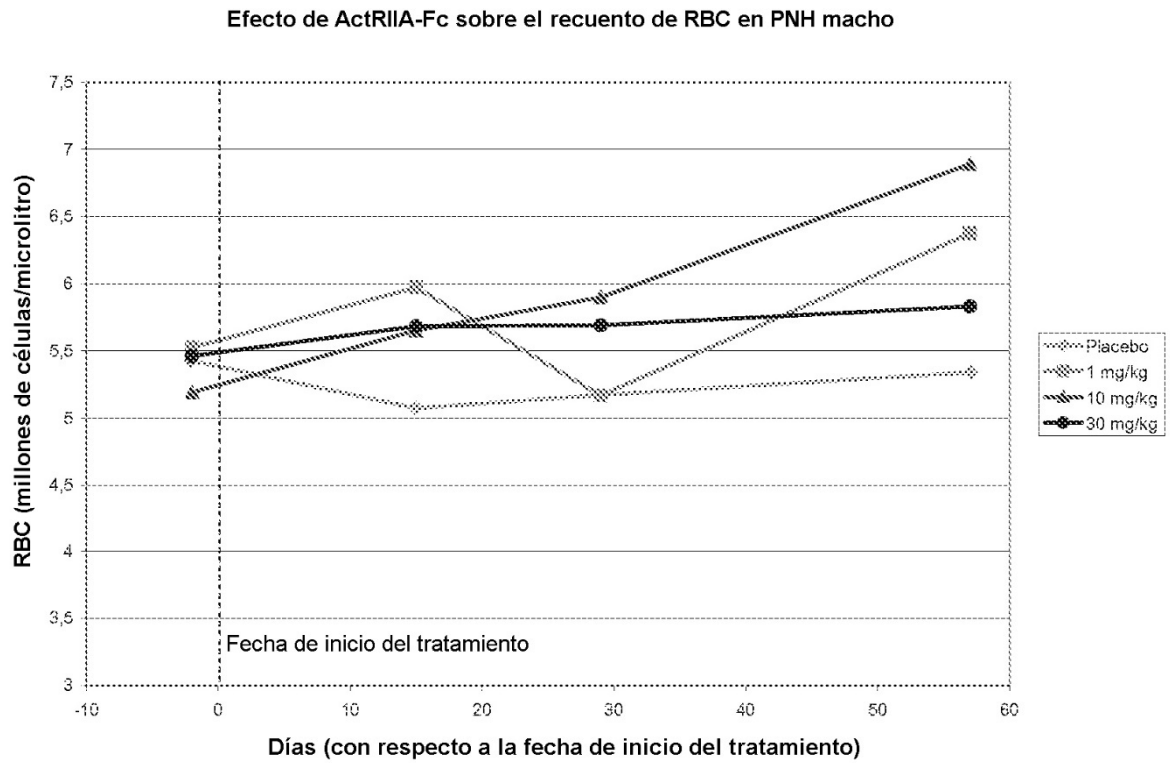


Figura 6B

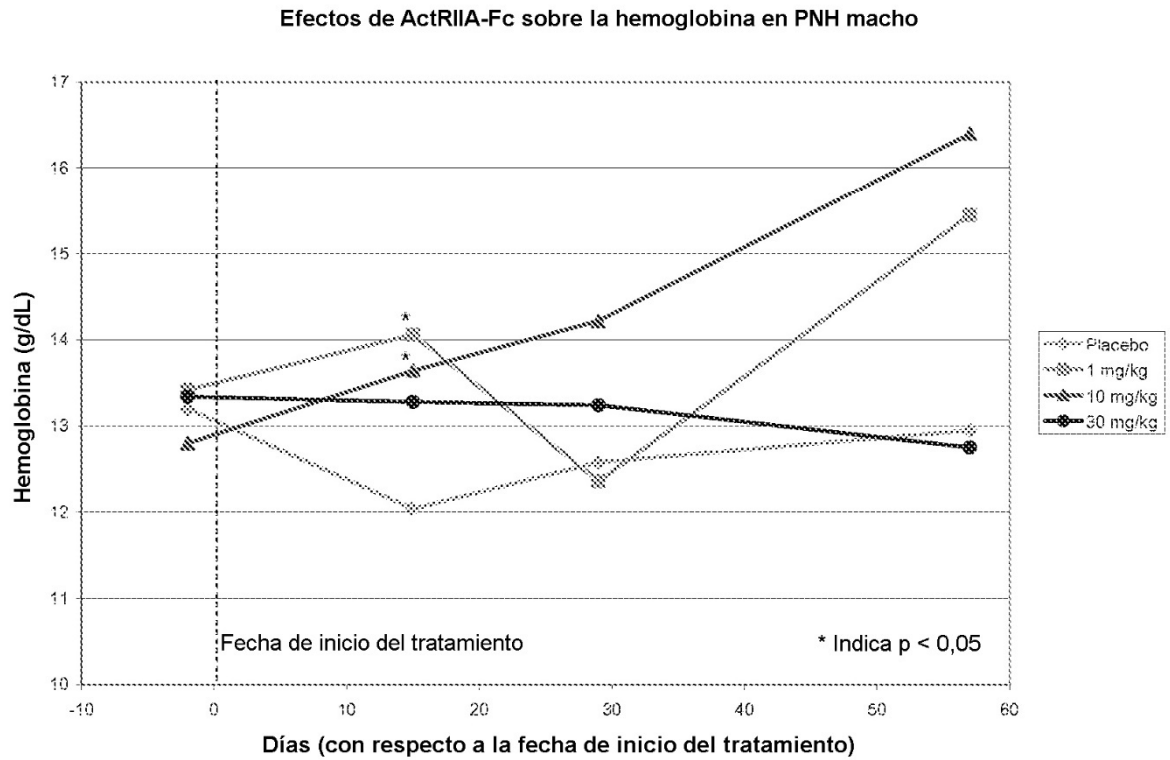




Figura 7A

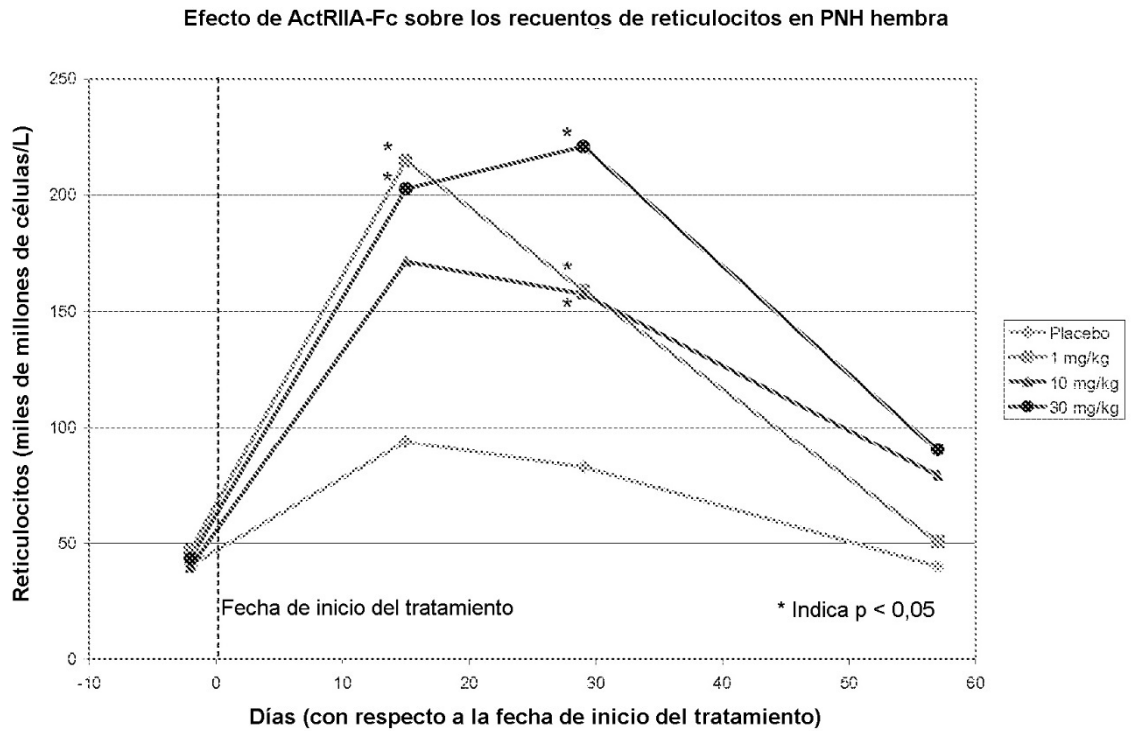
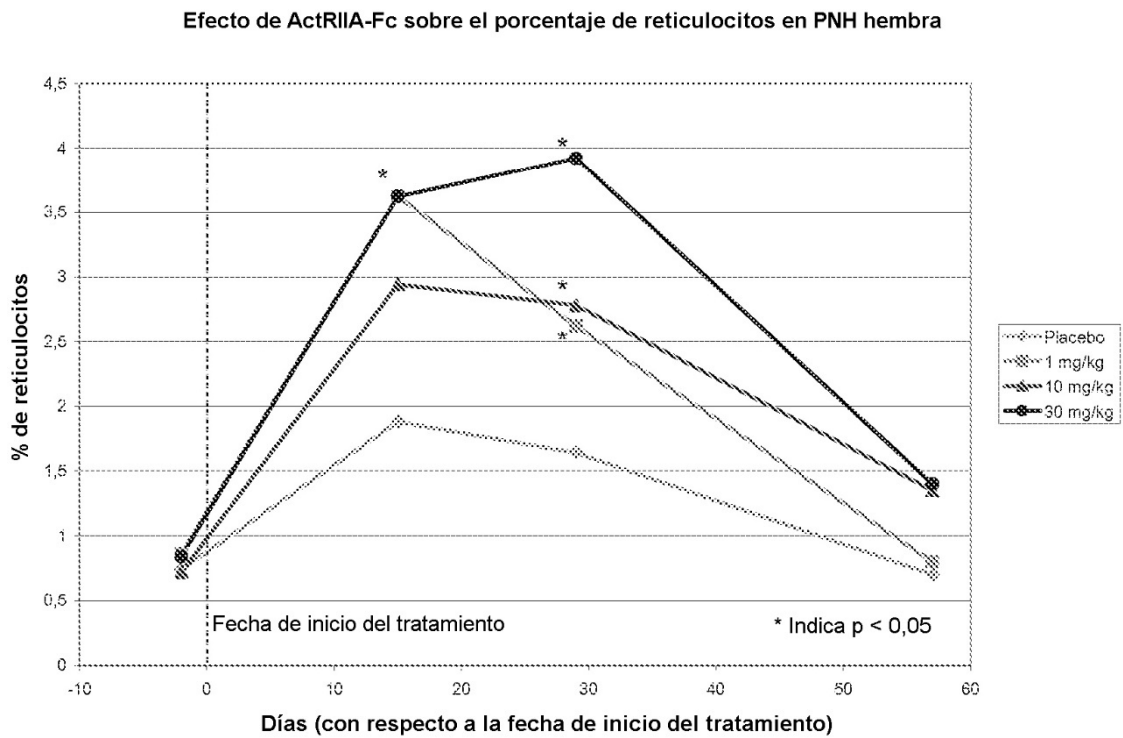


Figura 7B





Efecto de ActRIIA-Fc sobre los recuentos de reticulocitos en PNH macho

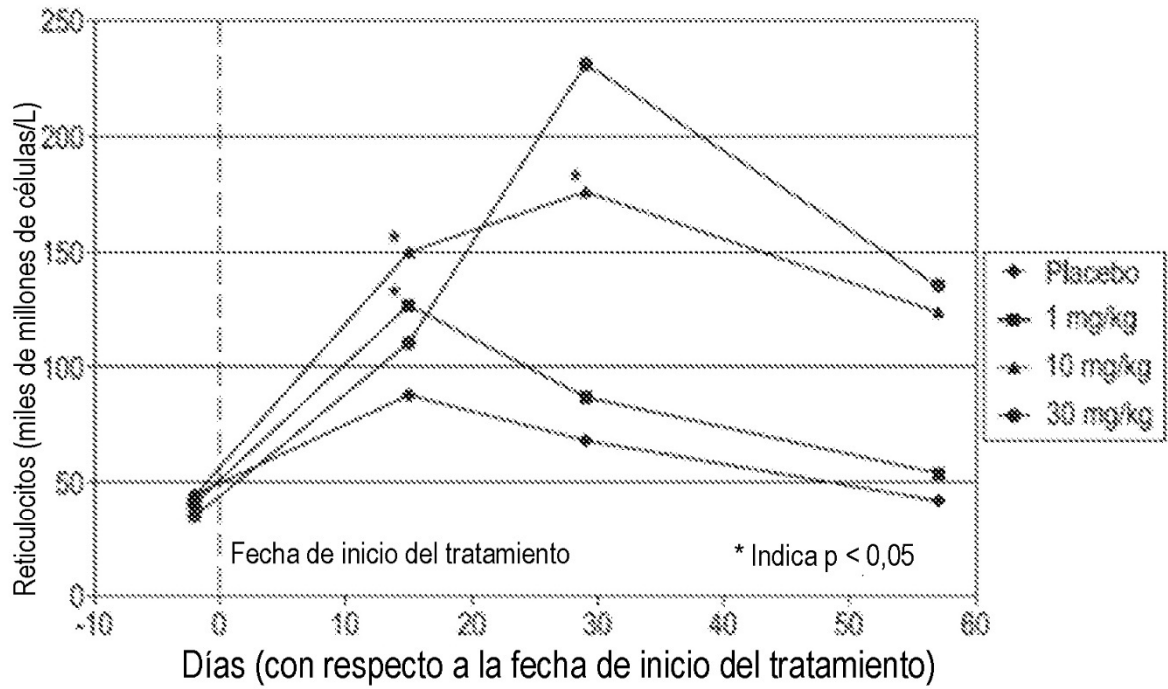


Figura 8A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre el porcentaje de reticulocitos en PNH macho

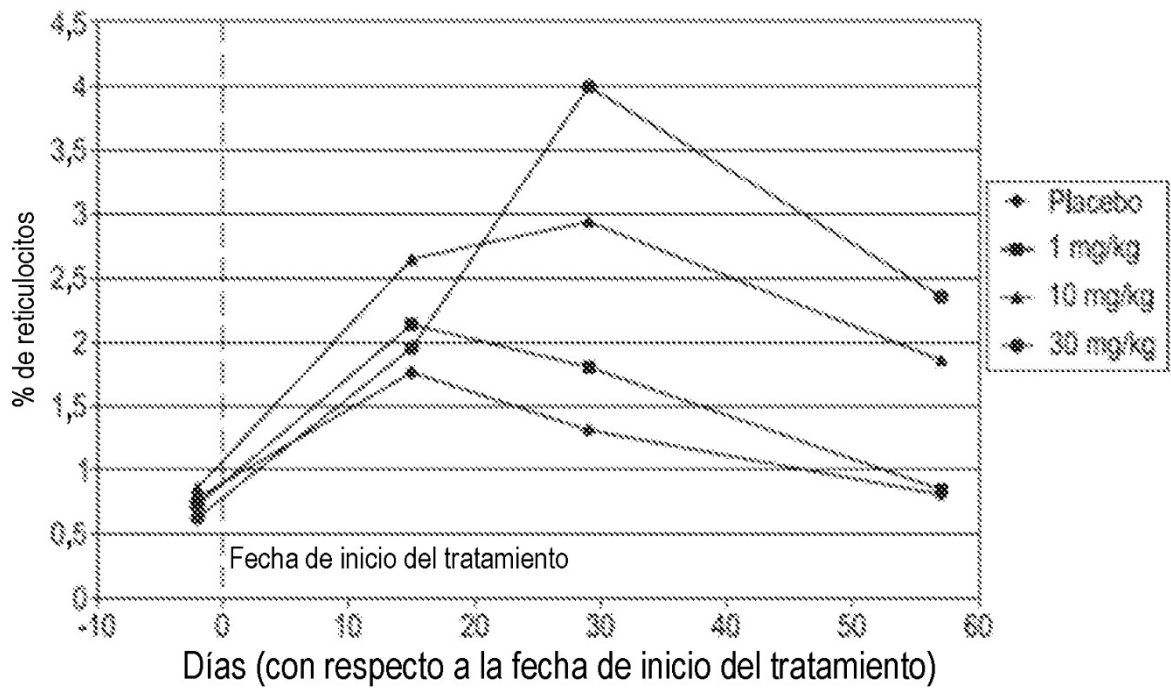


Figura 8B



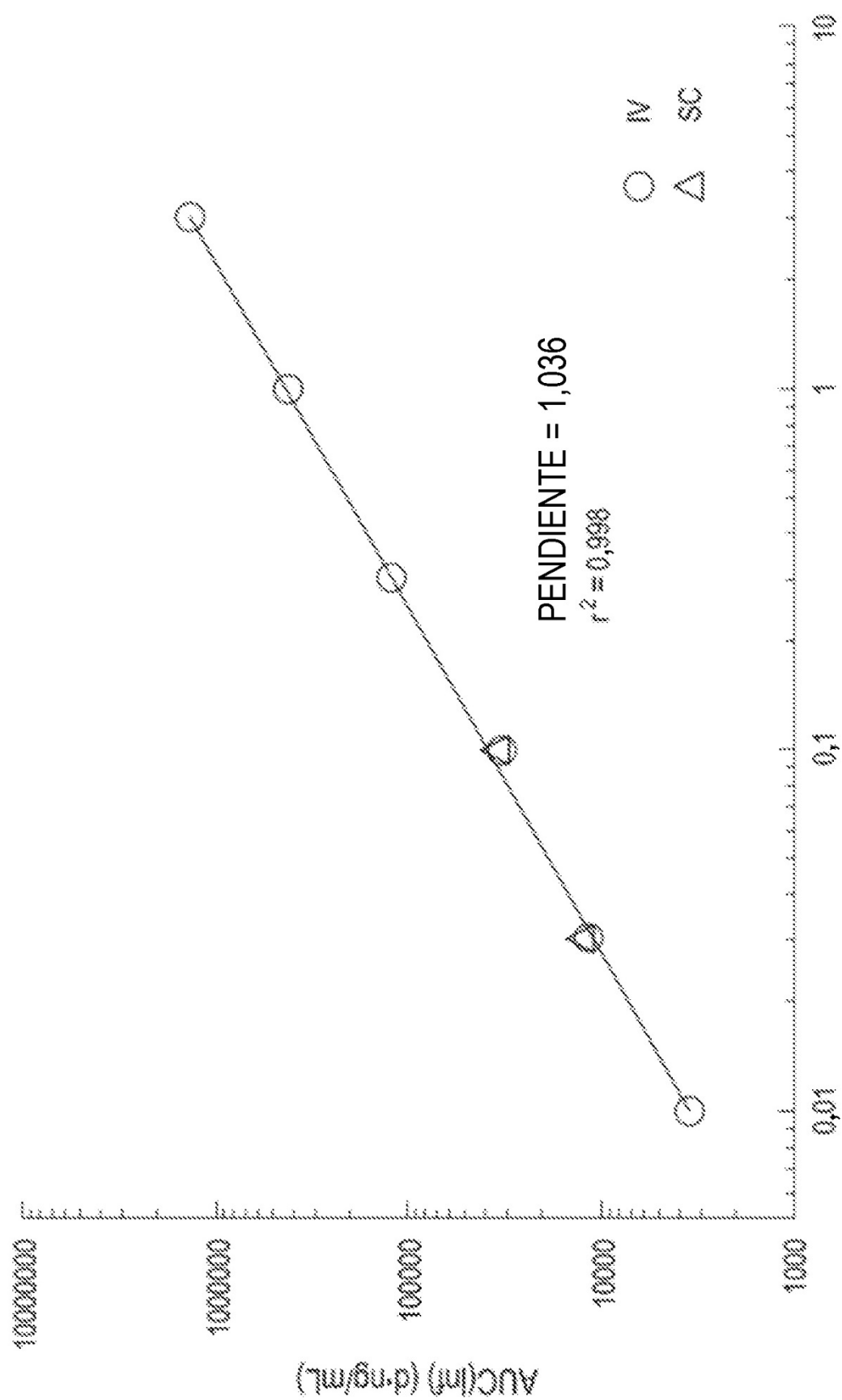


Figura 9



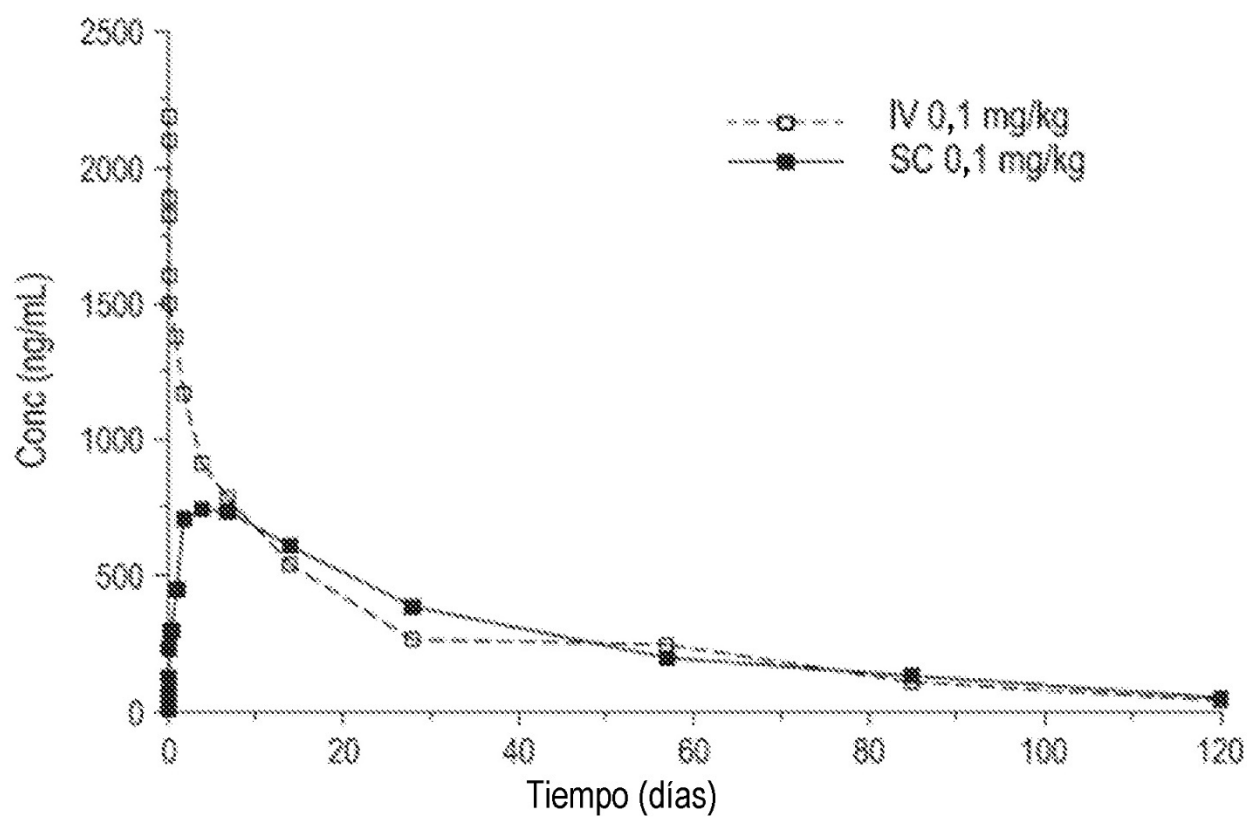


Figura 10



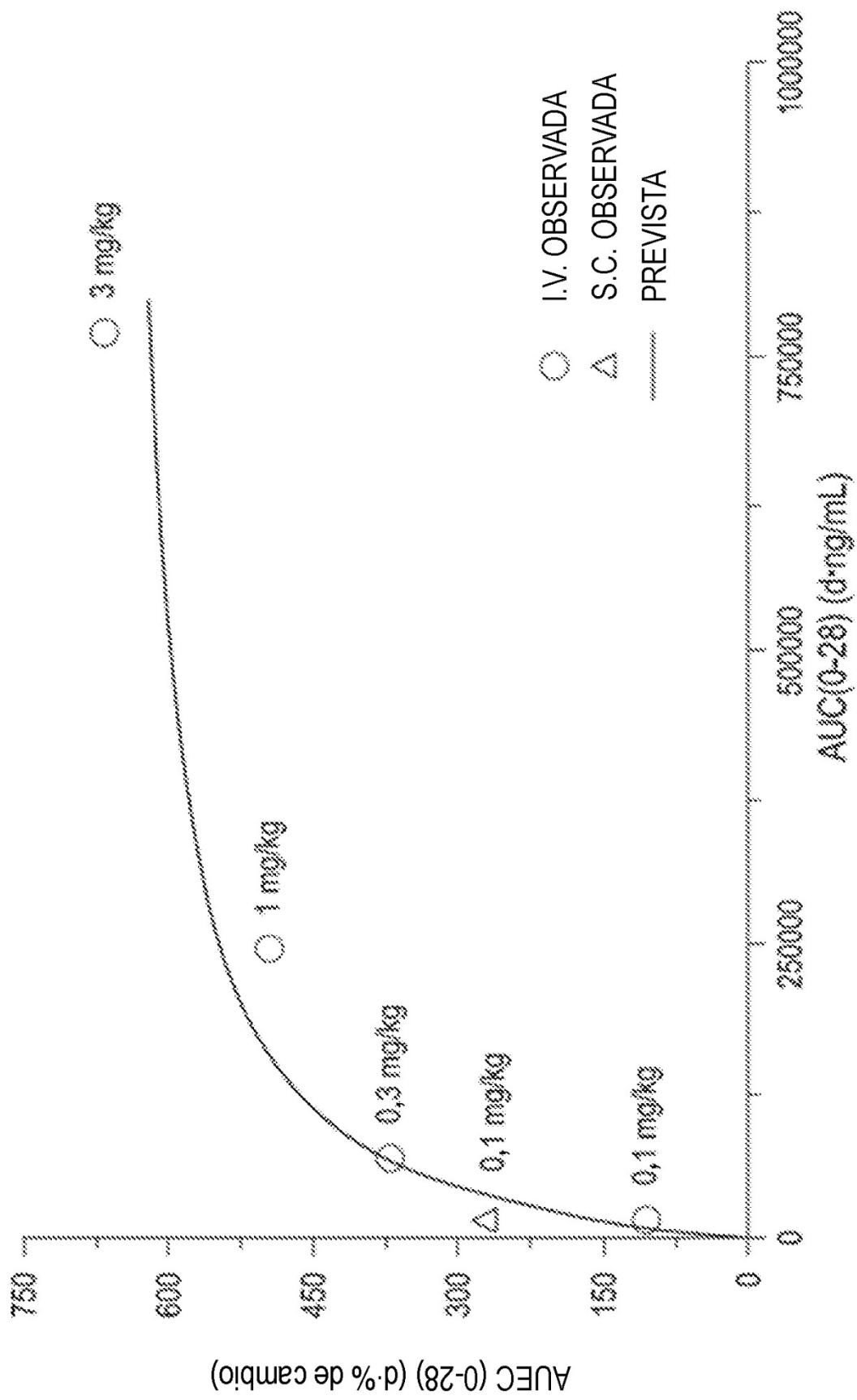


Figura 11



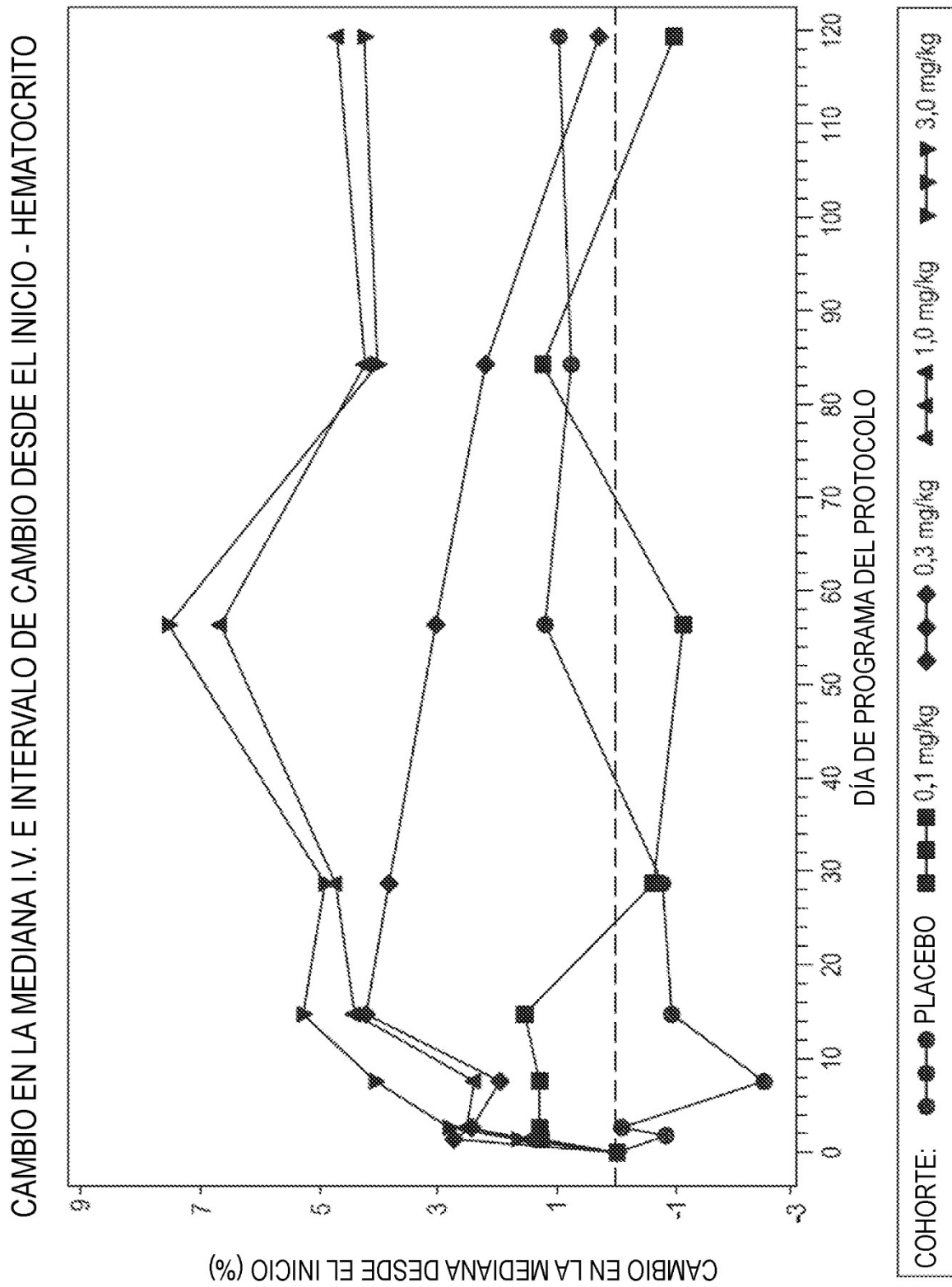


Figura 12



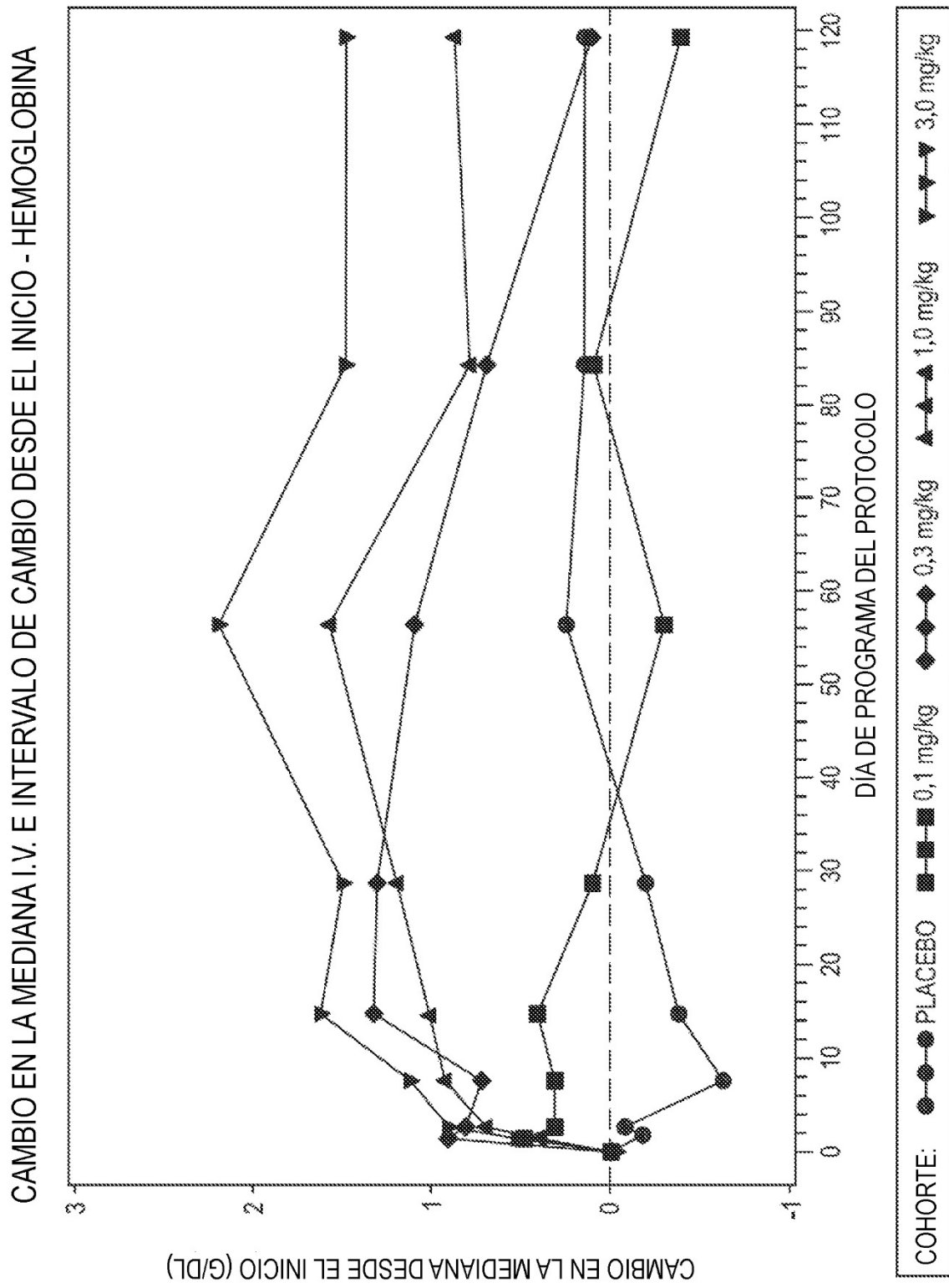


Figura 13



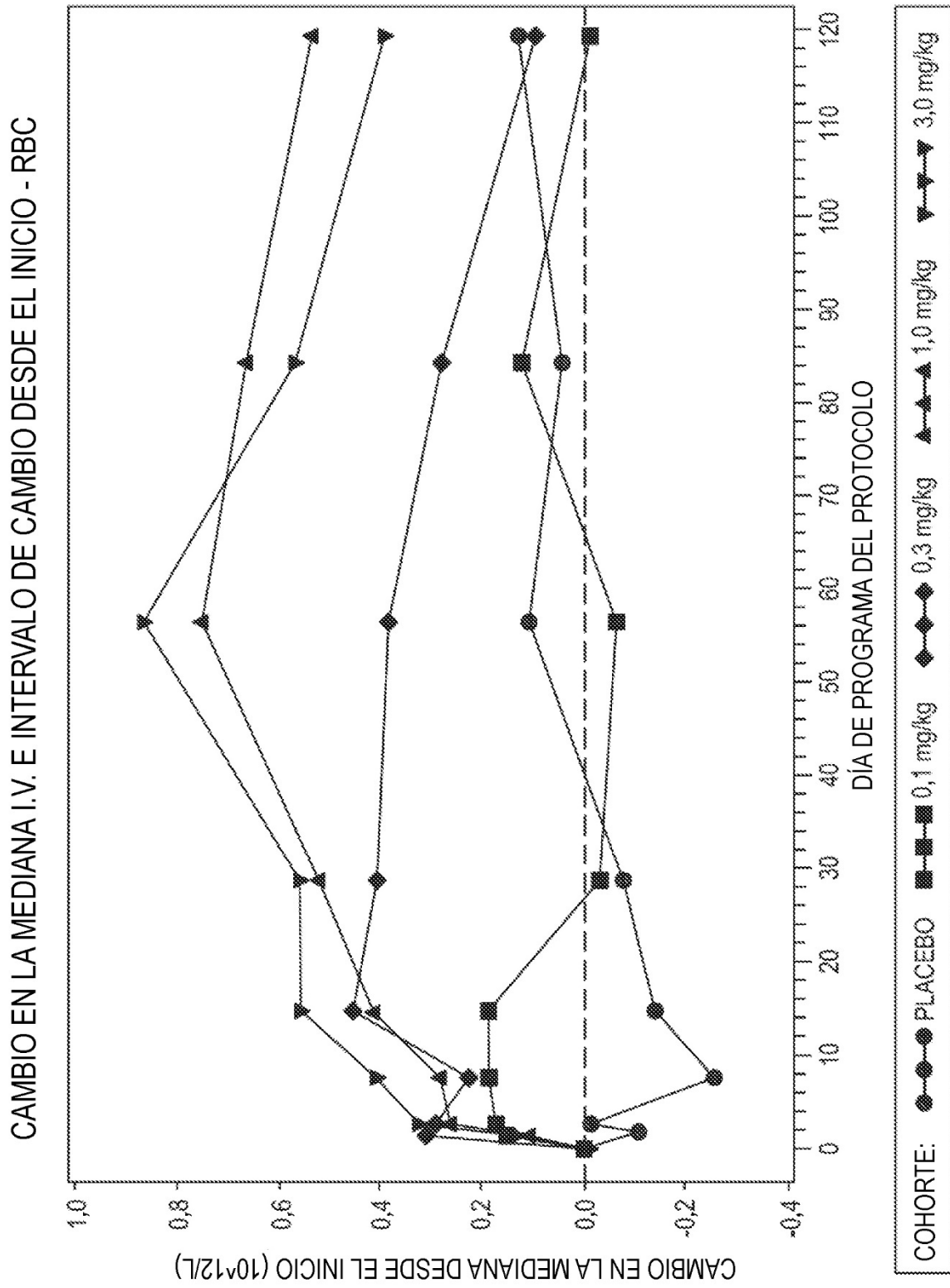


Figura 14



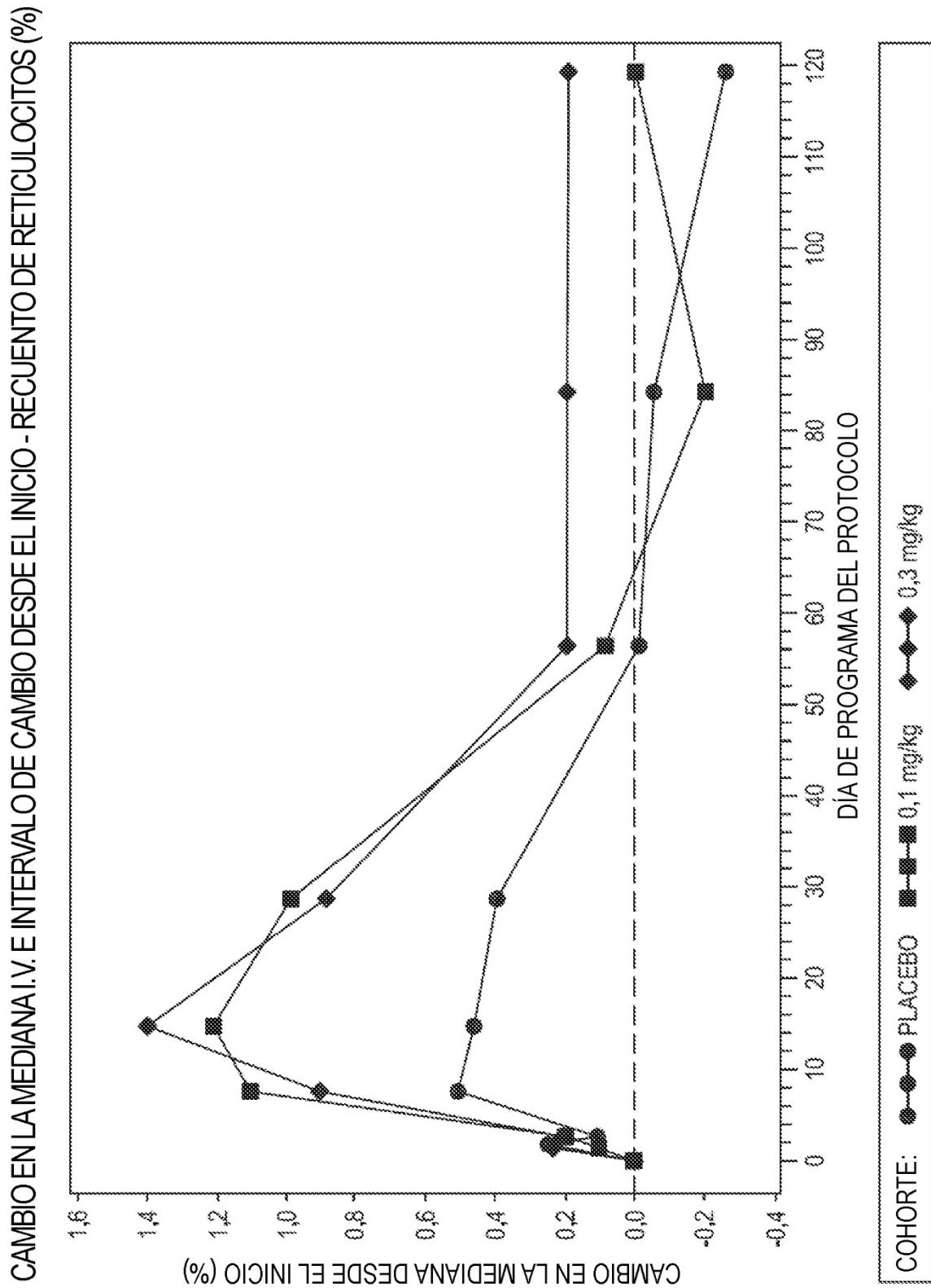


Figura 15



## ES 2 845 650 T3

1    MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS  
51    GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCDDDFNC YDRQECVATE  
101    ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPFC  
151    PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV  
201    DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
251    APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
301    EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH  
351    EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:38)

FIGURA 16



```

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
   GAGGACCCGC 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 AGACGTTGCT

351  GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
   CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401  CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
   GTGGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
   GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
   TGGGTTCCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551  TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
   ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601  GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
   CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651  CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
   GTTGTCGTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTCTGA

701  GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
   CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTGTGT TCGGGAGGGT

751  GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
   CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

```

FIGURA 17A



# ES 2 845 650 T3

```

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
      CTCACCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
      GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
      TGTTCCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
      CTCCGAGACG TGTGTTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC

1101 TAAATGA (SEQ ID NO:39)
      ATTTACT (SEQ ID NO:40)

```

FIGURA 17B



1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC  
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV  
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPF PTGGGTHTCP PCPAPELLGG  
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA  
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS  
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP  
301 ENNYKTTPPV LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT  
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIGURA 18



```

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 GCGCACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCCT GGAGCGCTGC
   TCGCGTTGAC 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 TACGCCCTCCT GGCGCAACAG
   CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC 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 F E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCCTC 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 GGGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CCGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAAC TCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGAATTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTCG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

```

FIGURA 19A



# ES 2 845 650 T3

```

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 CTGGACG GACCAGTTTC

851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901  GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTCTTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951  CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 42)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 43)

```

FIGURA 19B



1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
51 KGCWEDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
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: 44)

FIGURA 20



1   ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
51   KGCWEDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
101   TYEPPPT   (SEQ ID NO: 45)

FIGURA 21



```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                                     E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGGAATGT ATTTATTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ATGCTAATTG GGAACCTGAA CGGACGAACC AATCGGGCT CGAACGGTGT
   TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L E C Y A S W R N S
151 GAGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCTGCTT GGAGGAACCTC
   CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

S G T I E L V K K G C W D D D F
201 CTCGGGACG ATTGAACCTG TGAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCa
   GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N F Q V
251 ATTGTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTG
   TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAAATTTCTGT AATGAACGCT TTACCCACCT
   ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

P E A G G P E V T Y E P P P T
351 CCGGAAGGC GGCGGCCCG AGGTACCTA TGAACCCCG CCCACCGGTG
   GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCTTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA 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

```

FIGURA 22A



# ES 2 845 650 T3

```

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 GTCGTCCCCC

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAAG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 46)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 47)

```

FIGURA 22B



## ES 2 845 650 T3

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGA~~ACTCGAA~~ CGGACGAACC  
AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT  
GGAGGAAC~~TC~~ CTCGGGACG ATTGA~~ACTTG~~ TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA  
ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT  
GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGGGGSCCG  
AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACC (SEQ ID NO: 48)

FIGURA 23



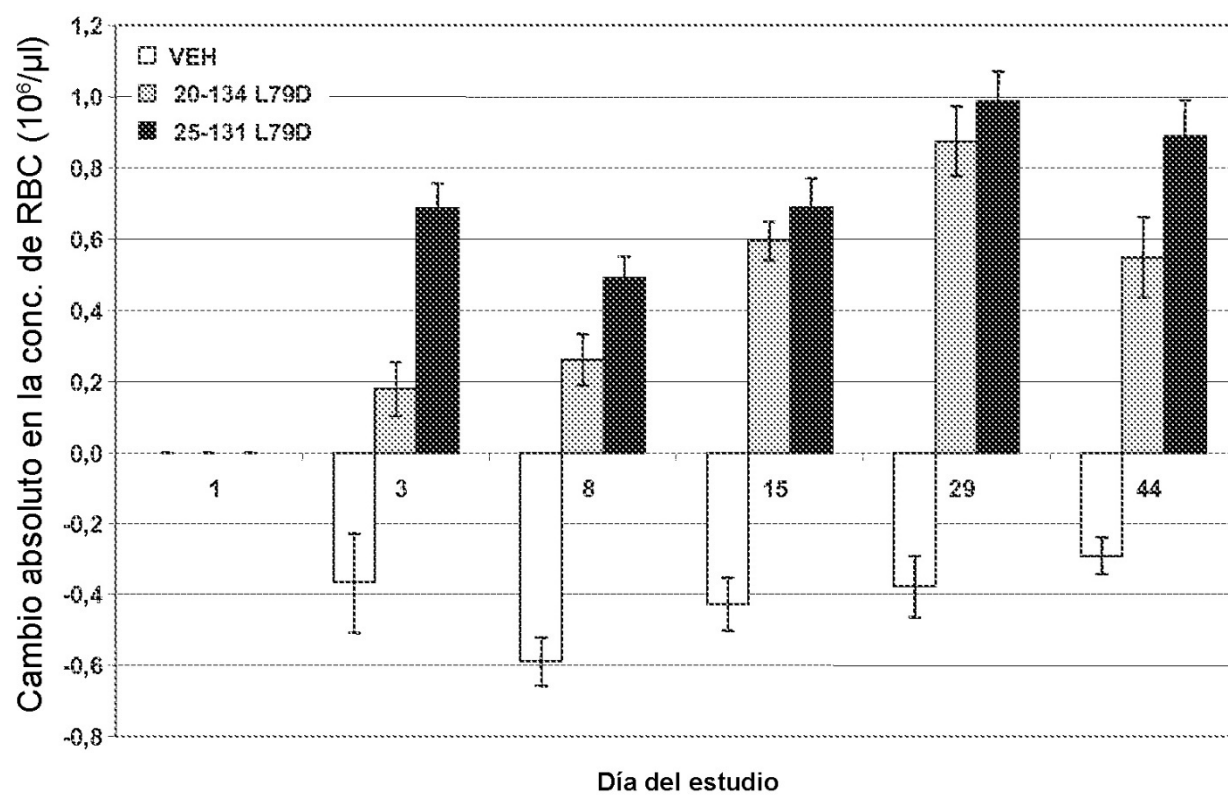


FIGURA 24



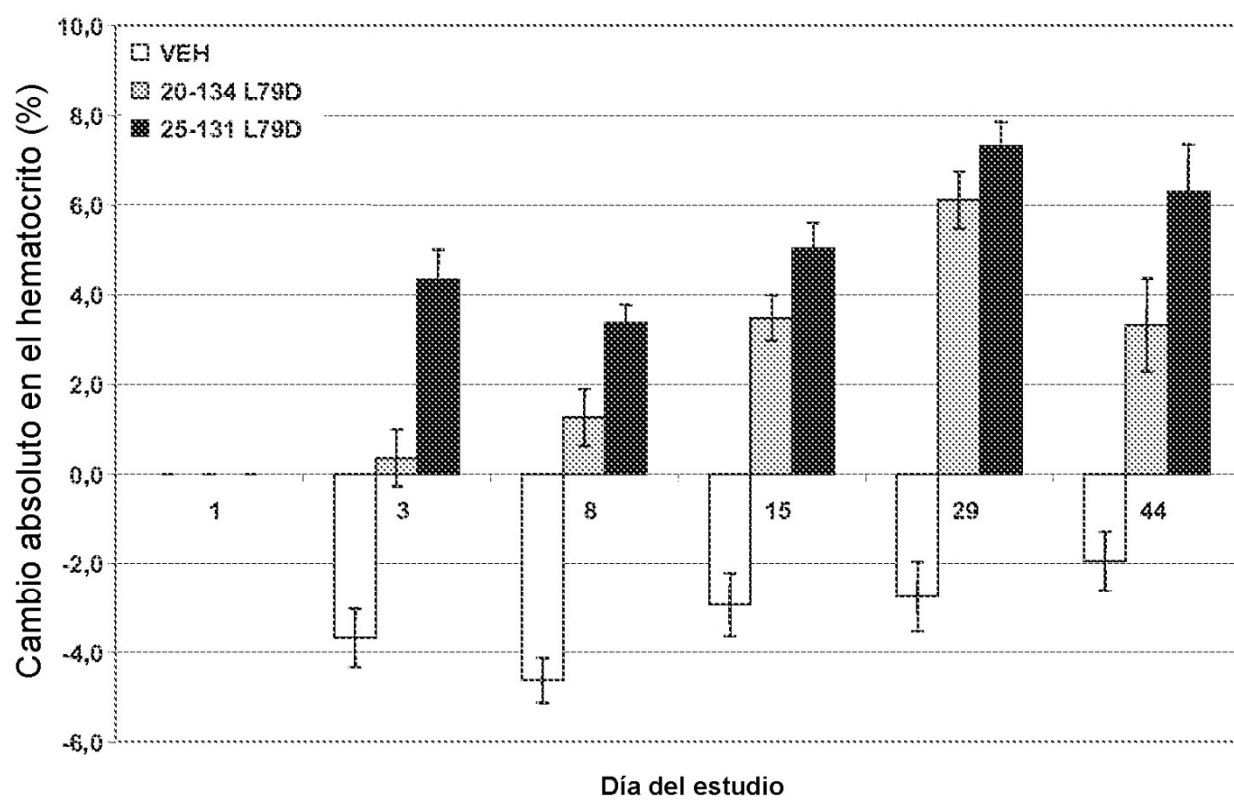


FIGURA 25



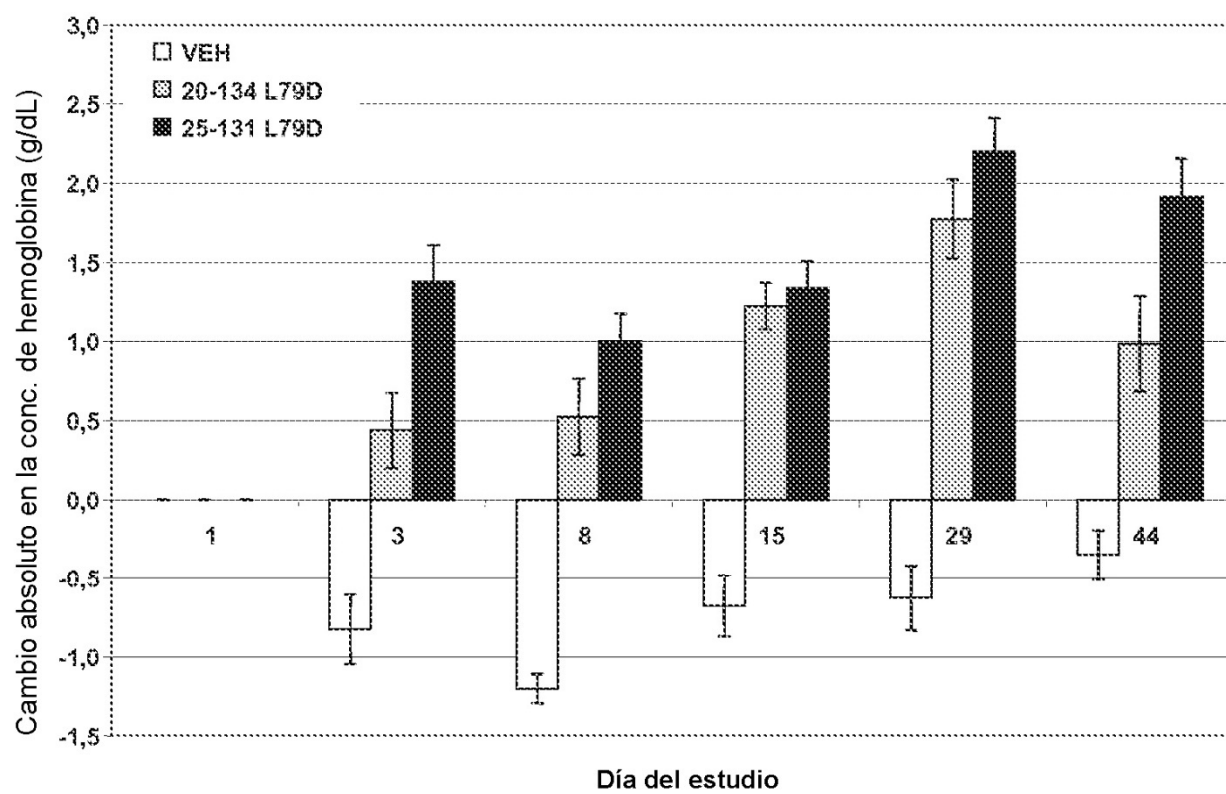


FIGURA 26



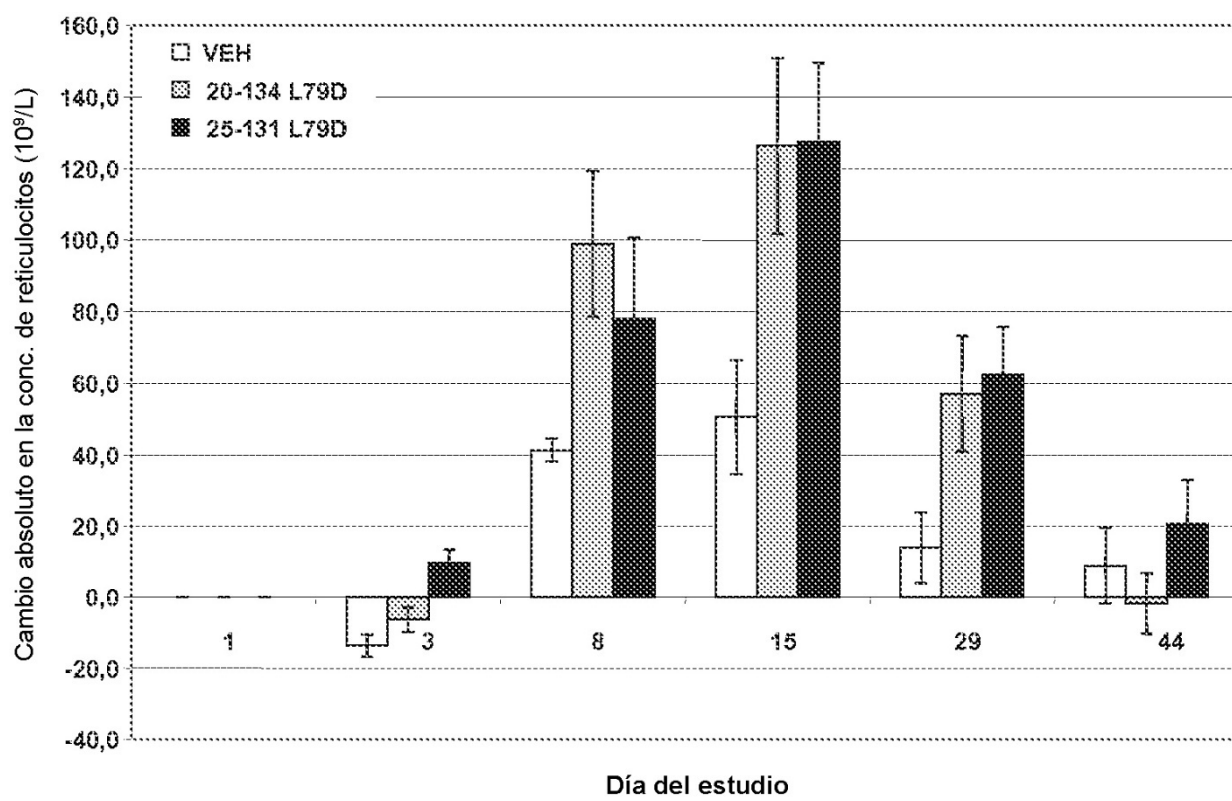


FIGURA 27



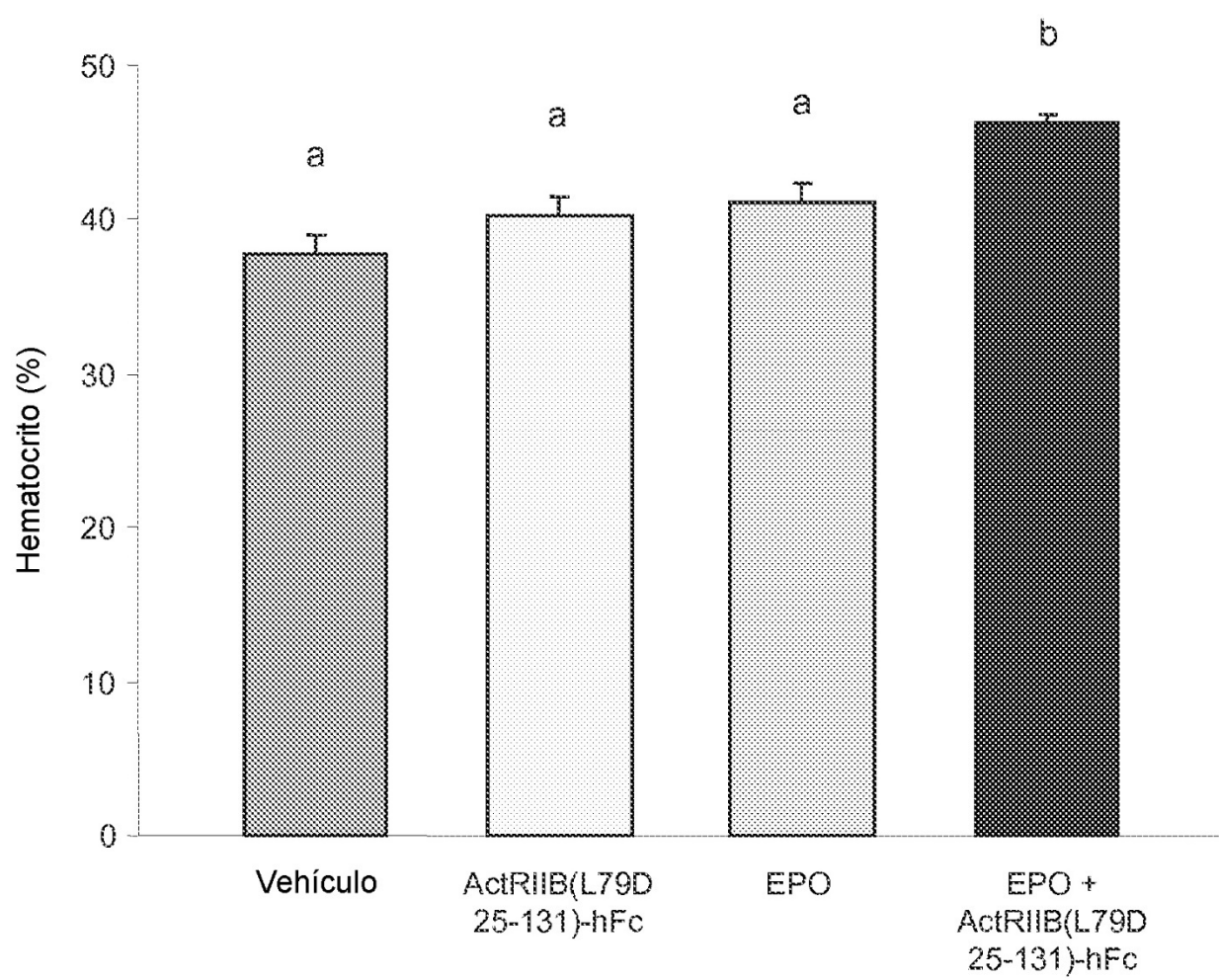


FIGURA 28



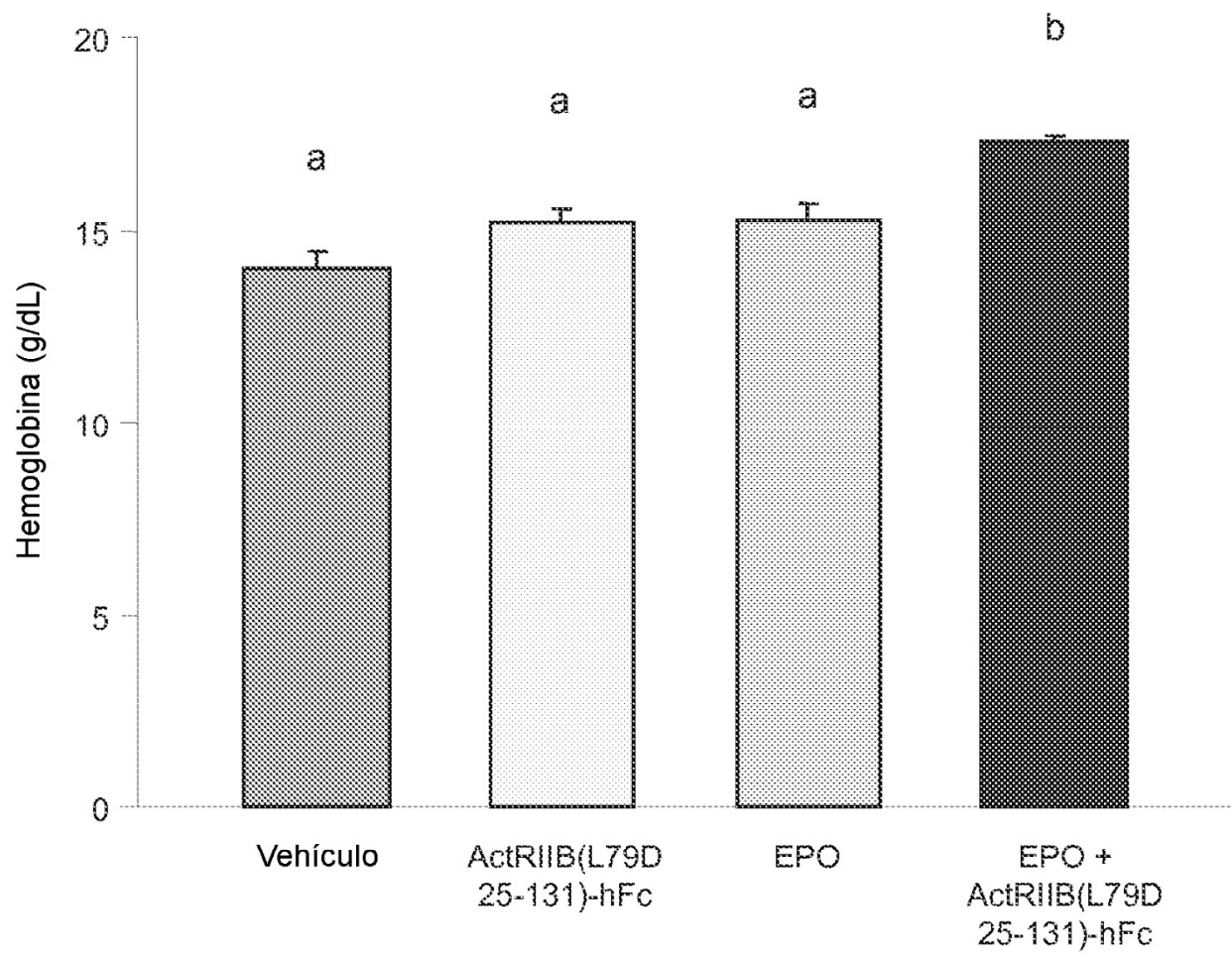


FIGURA 29



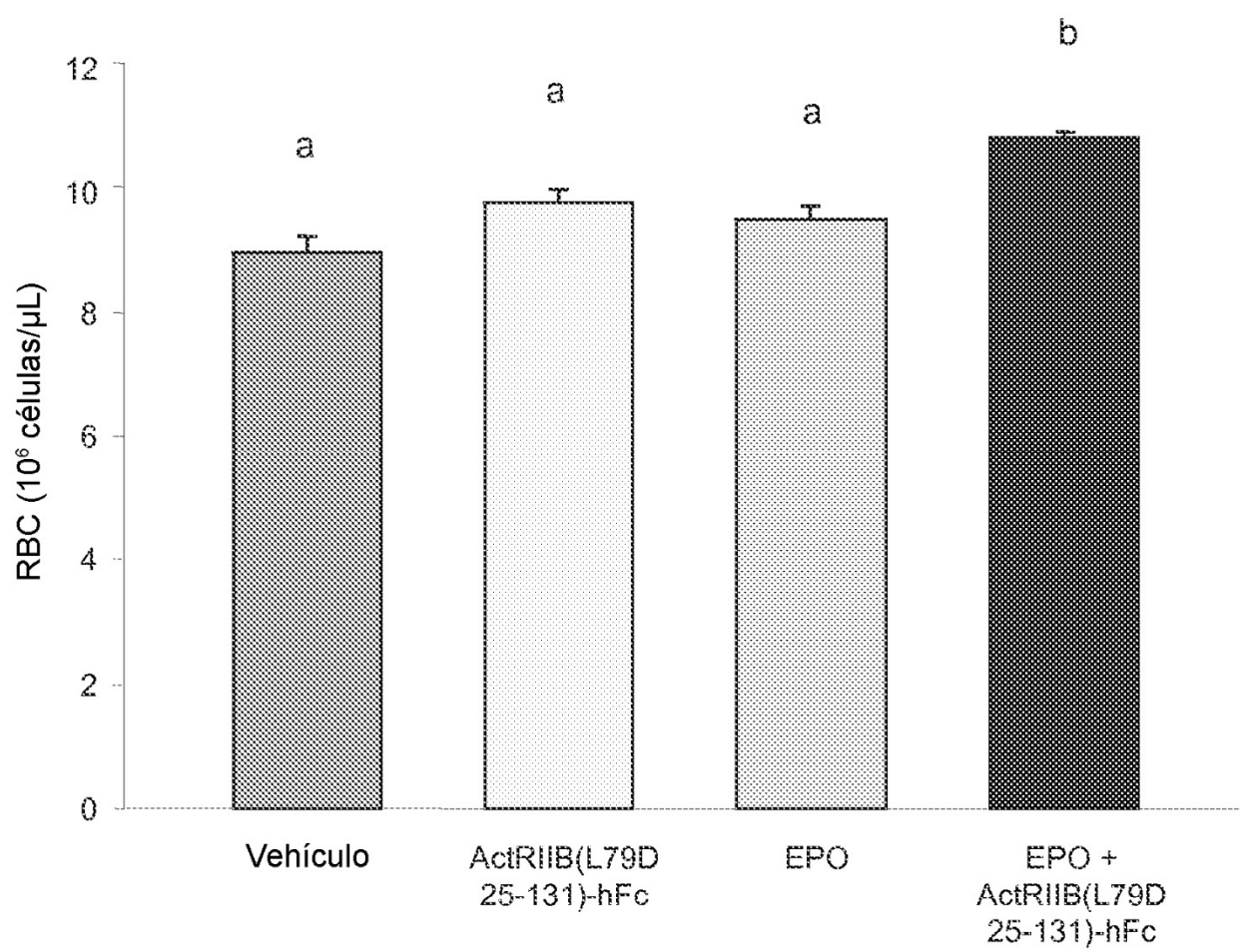


FIGURA 30



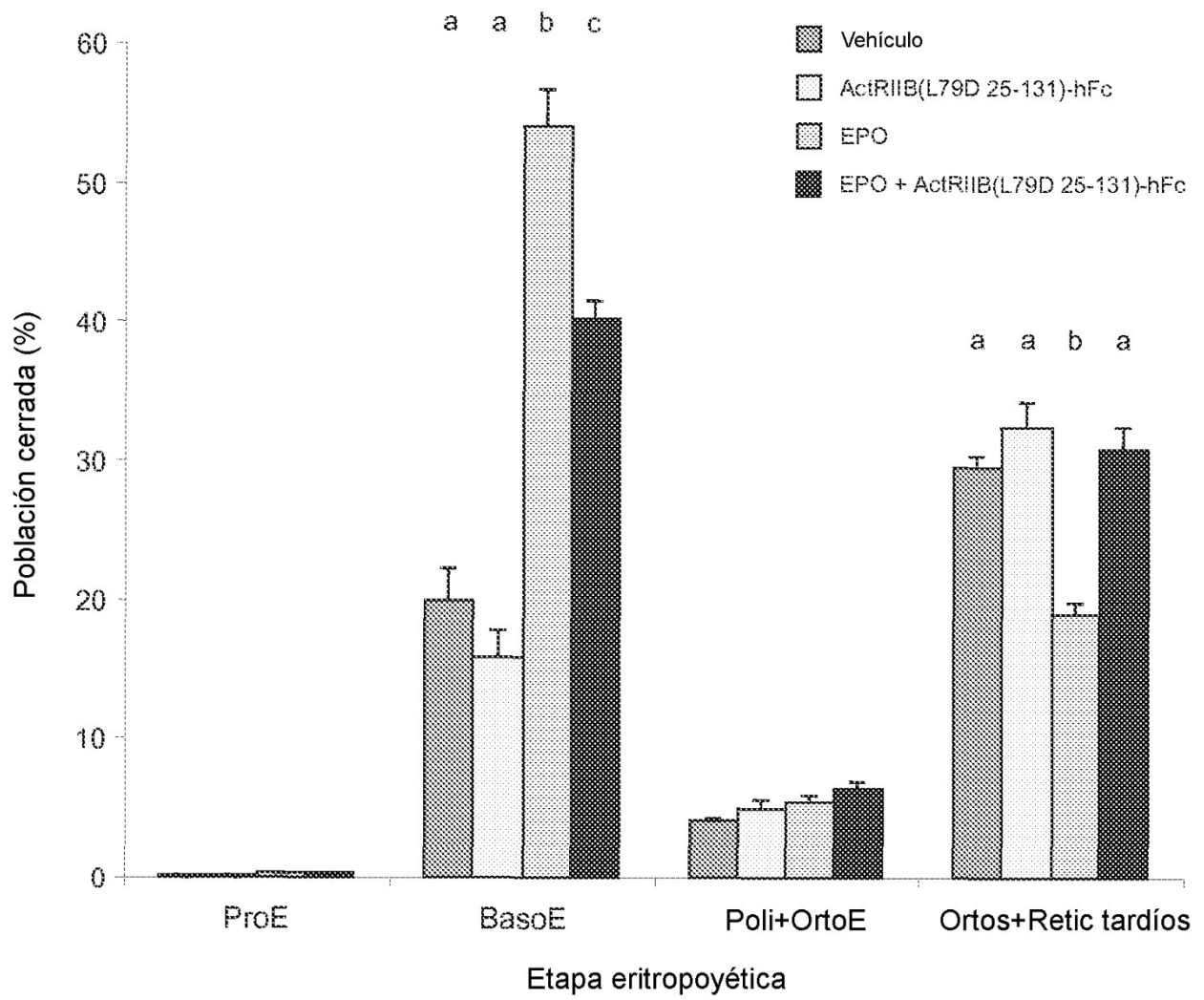
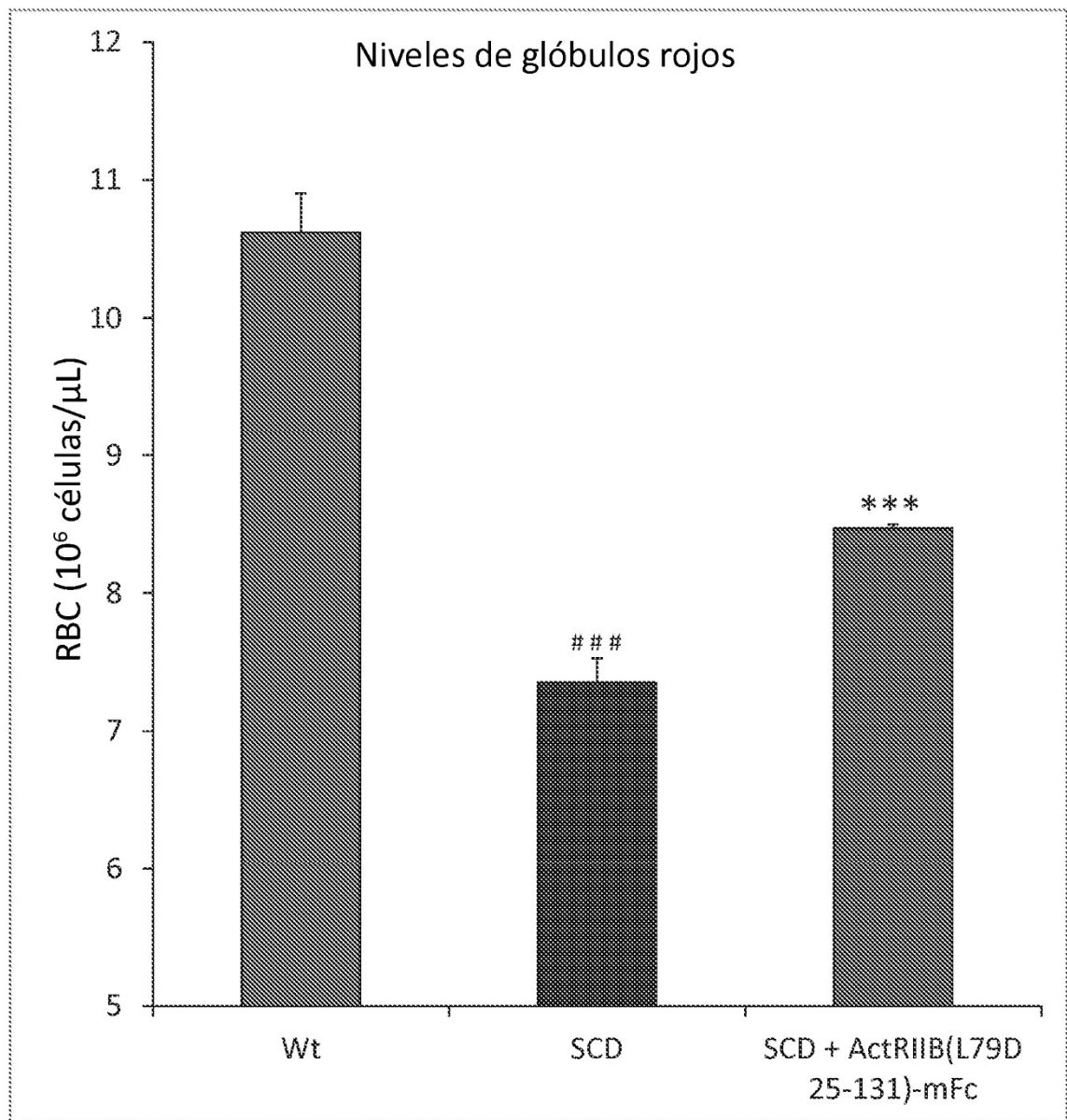


FIGURA 31

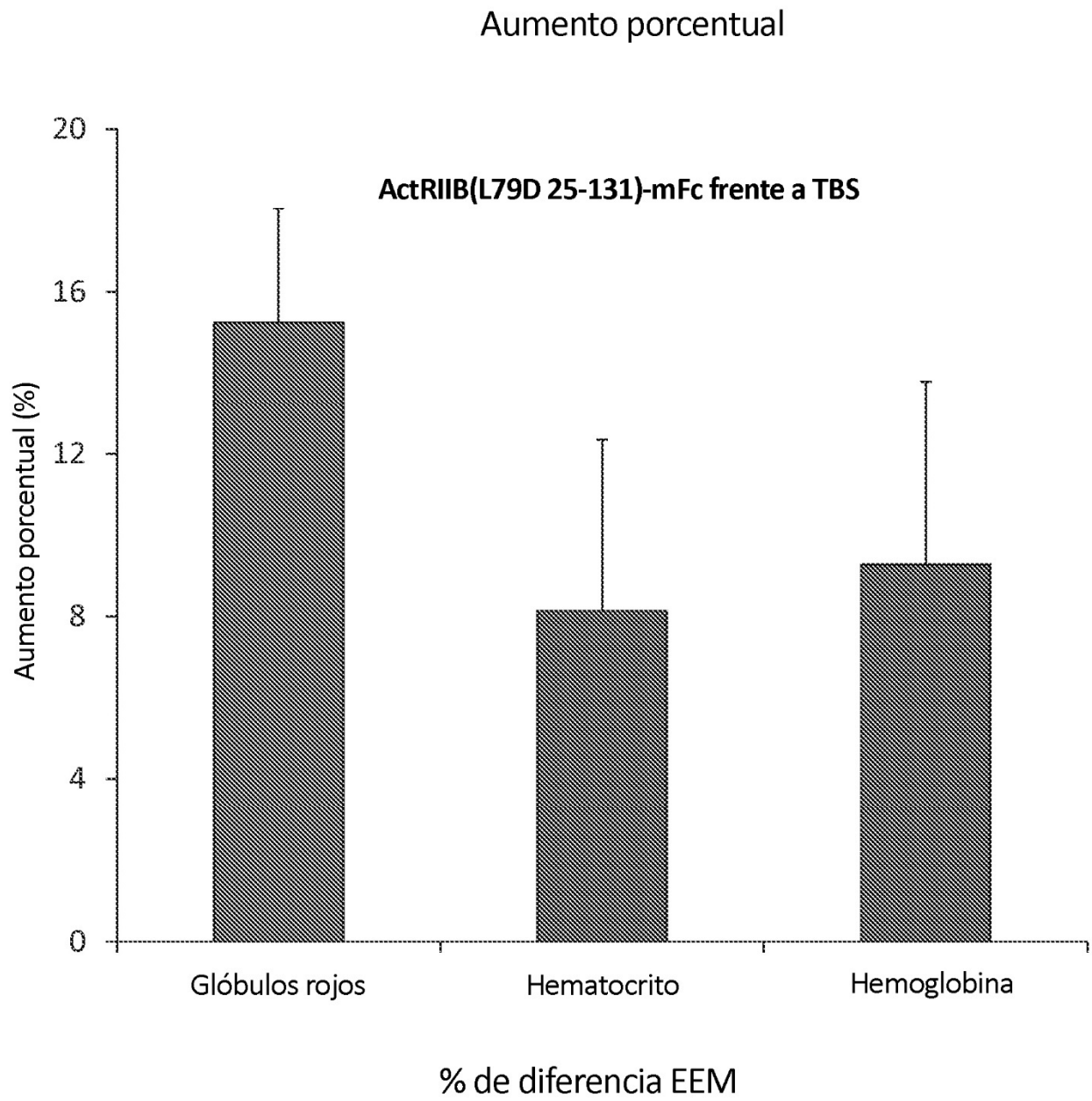




###  $p \leq 0,001$  frente a ratones de tipo natural \*\*\*  $p \leq 0,001$  frente a control de vehículo, N = 5 por grupo de tratamiento

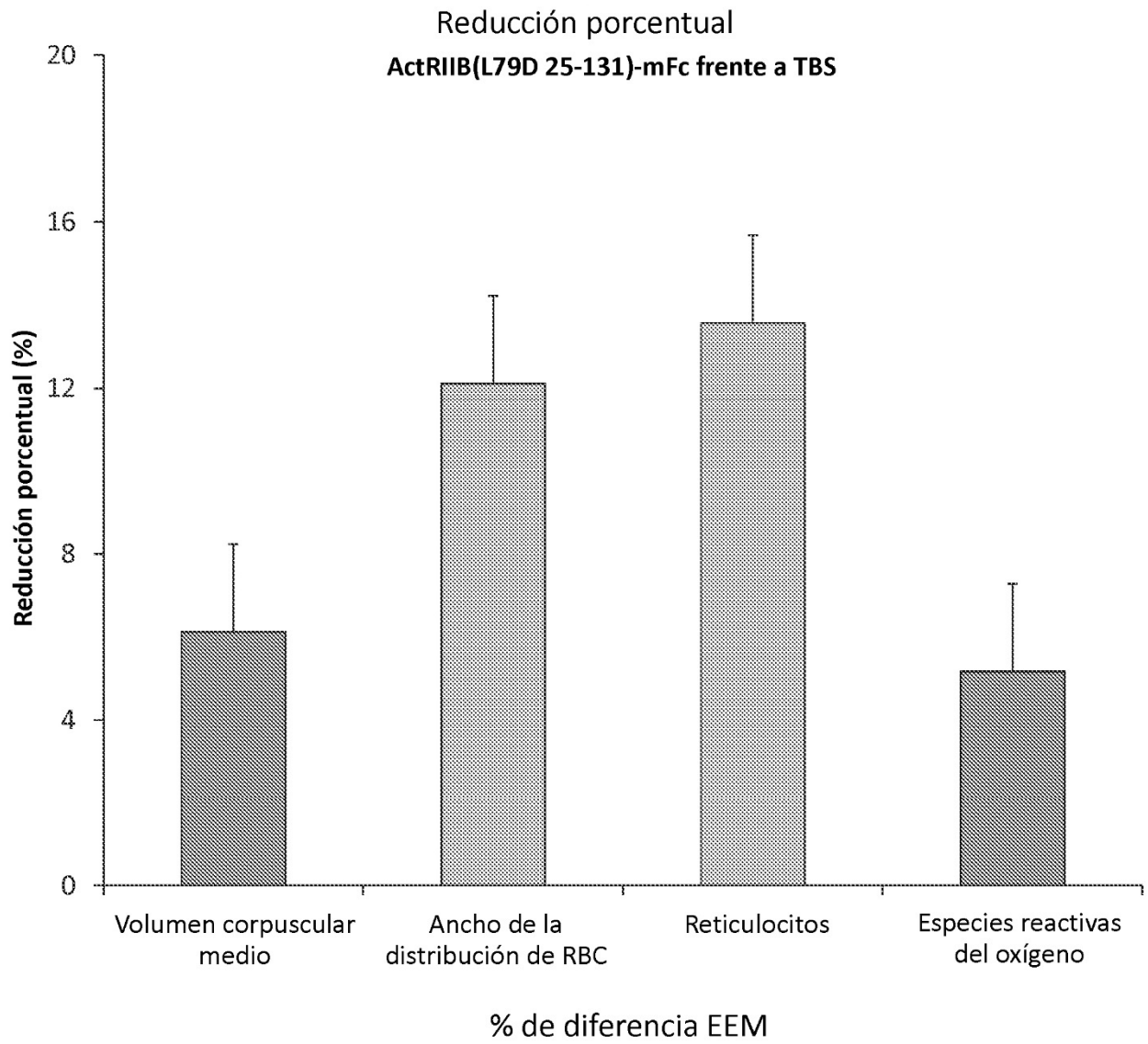
**FIGURA 32**





**FIGURA 33**





**FIGURA 34**



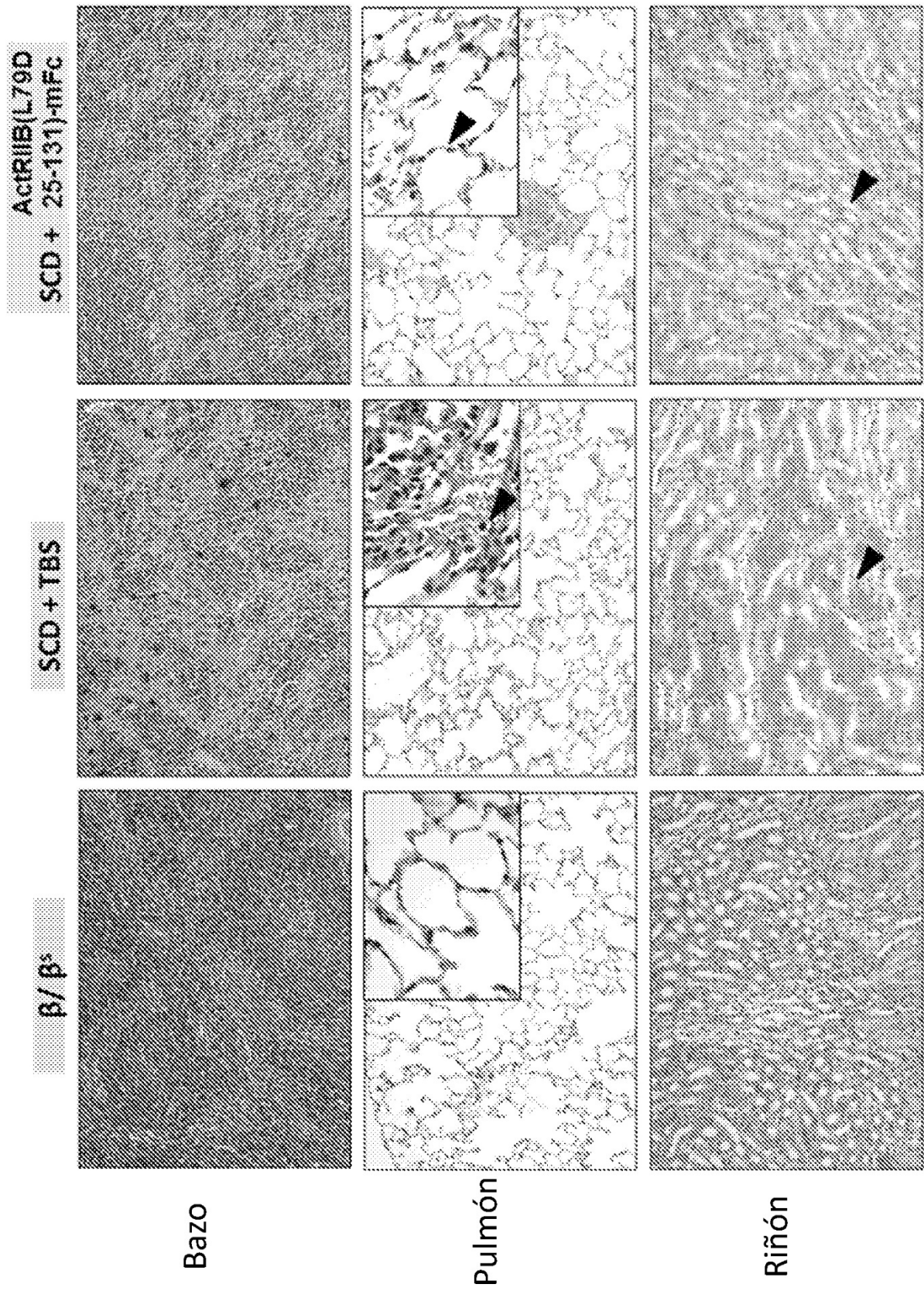


FIGURA 35



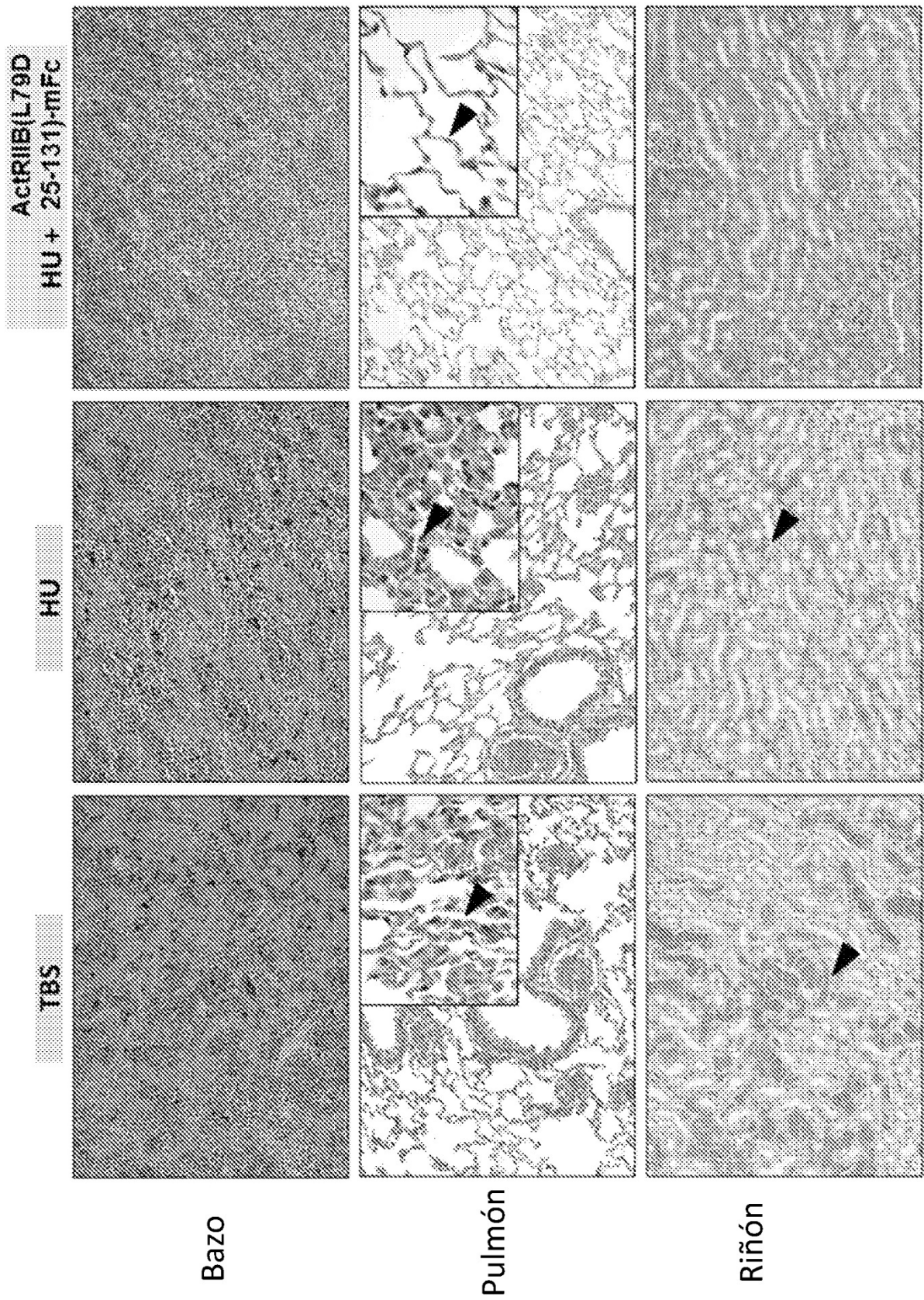


FIGURA 36