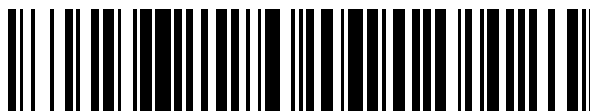


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 121**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2010 PCT/US2010/045509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11020045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2010 E 10808838 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2464369**

54 Título: **Uso combinado de trampas de GDF y activadores del receptor de la eritropoyetina para aumentar los niveles de glóbulos rojos**

30 Prioridad:

13.08.2009 WO PCT/US2009/004659

13.08.2009 US 583177

18.02.2010 US 305901 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

73 Titular/es:

ACCELERON PHARMA INC. (100.0%)

**128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SEEHRA, JASBIR;
PEARSALL, ROBERT, SCOTT y
KUMAR, RAVINDRA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 796 121 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

Uso combinado de trampas de GDF y activadores del receptor de la eritropoyetina para aumentar los niveles de glóbulos rojos

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los glóbulos rojos maduros, o eritrocitos, son los responsables del transporte de oxígeno del aparato circulatorio de los vertebrados. Los glóbulos rojos contienen altas concentraciones de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión parcial relativamente alta de oxígeno (pO_2) y suministra oxígeno a las zonas del cuerpo con una pO_2 relativamente baja.

Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un procedimiento denominado eritropoyesis. La eritropoyesis postnatal se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas vías de señalización controla el equilibrio de la proliferación, 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 el aumento o disminución de la tensión de oxígeno o la demanda tisular. El procedimiento de la eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras diferenciadas del linaje y continúa 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 el torrente sanguíneo y pierden sus mitocondrias y ribosomas mientras adoptan la morfología de glóbulos rojos maduros. Un nivel elevado de reticulocitos, o una relación elevada de reticulocito:eritrocito, en la sangre es indicativo de un aumento en la velocidad de producción de glóbulos rojos.

La eritropoyetina (EPO) se reconoce ampliamente como el regulador positivo más importante de la eritropoyesis postnatal en los vertebrados. La EPO regula la respuesta eritropoyética compensatoria a una tensión de oxígeno reducida en los tejidos (hipoxia) y niveles bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina. En los seres humanos, los niveles de EPO elevados favorecen la formación de glóbulos rojos mediante la estimulación de la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En los ratones, la EPO mejora la eritropoyesis principalmente en el bazo.

Un receptor de la superficie celular que pertenece a la superfamilia de receptores de la citocina media los efectos de la EPO. El gen del receptor de la EPO humana codifica una proteína transmembrana de 483 aminoácidos, mientras que se cree que el receptor de la EPO activo existe como un complejo multimérico incluso en ausencia de un ligando (véase la patente estadounidense n.º 6.319.499). El receptor de la EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamífero se une a la EPO con una afinidad similar a la del receptor natural en células progenitoras eritroides. La unión de la EPO a su receptor provoca un cambio conformacional que da lugar a la activación del receptor y a efectos biológicos que incluyen aumento de la proliferación de eritroblastos inmaduros, aumento de la diferenciación de eritroblastos inmaduros y disminución de la apoptosis en células progenitoras eritroides (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 una variedad de entornos clínicos y, en particular, para el tratamiento de la anemia. La anemia es una afección definida ampliamente caracterizada por unos niveles inferiores a lo normal de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre. En algunos aspectos, un trastorno primario en la producción o supervivencia de los glóbulos rojos provoca la anemia. Más comúnmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros aparatos (Weatherall y Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia puede ser el resultado de una reducción en la velocidad de producción o de un aumento en la velocidad de destrucción de los glóbulos rojos o de una pérdida de glóbulos rojos debido a hemorragia. La anemia puede ser el resultado de una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, tratamiento quimioterápico, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

El tratamiento con EPO normalmente provoca un aumento en la hemoglobina en aproximadamente 1-3 g/dl en seres humanos sanos durante un periodo de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, esta pauta de tratamiento a menudo proporciona un aumento sustancial en los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos y lleva a mejoras en la calidad de vida y supervivencia prolongada. La EPO no es eficaz de forma uniforme, y muchos individuos son resistentes incluso a dosis altas (Horl y col., (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Más de un 50 % de pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la EPO, aproximadamente un 10 % con insuficiencia renal terminal son hiporreactivos (Glaspy y col., (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri y col., (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), y menos de un 10 % con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey, (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Diversos factores, que incluyen inflamación, deficiencia de hierro y de vitaminas, diálisis

inadecuada, toxicidad del aluminio e hiperparatiroidismo pueden predecir una mala respuesta terapéutica. Los mecanismos moleculares de resistencia a la EPO son todavía poco claros. Las pruebas recientes sugieren que las dosis más altas de EPO se pueden asociar con un mayor riesgo de morbilidad cardiovascular, crecimiento tumoral y mortalidad en algunas poblaciones de pacientes (Krapf y col., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Por lo tanto, se ha recomendado que los compuestos terapéuticos basados en EPO (agentes estimulantes de la eritropoyesis, AEE) se administren a la dosis más baja suficiente para evitar la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos (Jelkmann y col., 2008, Crit Rev Oncol. Hematol 67:39-61).

Por tanto, es un objetivo de la presente descripción proporcionar procedimientos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes, lo que permitiría el uso de dosis reducidas de activadores del receptor de la eritropoyetina.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

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

Esta sinergia puede ser ventajosa, ya que permite que se alcancen niveles objetivo de los glóbulos rojos con dosis más bajas de un activador del receptor de la EPO, lo que evita así los posibles efectos adversos u otros problemas asociados con niveles más altos de activación del receptor de la EPO.

Un activador del receptor de la EPO puede estimular la eritropoyesis al entrar en contacto directamente y activar el receptor de la EPO. En ciertos aspectos, el activador del receptor de la EPO es uno de una clase de compuestos basados en la secuencia de 165 aminoácidos de la EPO natural y conocido en general como agente estimulante de la eritropoyesis (AEE), cuyos ejemplos son epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta y epoetina omega. En otros aspectos, los AEE incluyen proteínas EPO sintéticas (SEP) y derivados de EPO con modificaciones no peptídicas que confieren propiedades farmacocinéticas deseables (semivida de circulación prolongada), cuyos ejemplos son darbepoetina alfa y metoxi-polietilenglicol epoetina beta. En ciertos aspectos, un activador del receptor de la EPO puede ser un agonista del receptor de la EPO que no incorpora la cadena principal del polipéptido de EPO o no se clasifica en general como un AEE. Los agonistas de este tipo de los receptores de la EPO pueden incluir, pero no se limitan a, miméticos peptídicos y no peptídicos de EPO, anticuerpos agonistas dirigidos al receptor de la EPO, proteínas de fusión que comprenden un dominio mimético de EPO y agonistas limitados de duración prolongada del receptor de la eritropoyetina (EREDLA).

En ciertos aspectos, un activador del receptor de la EPO puede estimular la eritropoyesis indirectamente, sin entrar en contacto con el propio receptor de la EPO, mediante la mejora de la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimuladores endógenos de la expresión del gen de EPO que se suprimen (desestabilizan) en condiciones de normoxia por los mecanismos reguladores celulares. En parte, la descripción proporciona un aumento de la eritropoyesis en un paciente mediante el tratamiento combinado con una trampa de GDF y un activador indirecto del receptor de la EPO con propiedades estabilizantes de HIF, tales como un inhibidor de prolil-hidroxilasa.

Las variantes de polipéptidos de ActRIIB que tienen una afinidad disminuida de manera significativa para la activina (por ejemplo, activina A y/o activina B) con respecto a otros ligandos de ActRIIB, tales como GDF11 y/o miostatina, se conocen como trampas de GDF. Las variantes de ActRIIB descritas en esta solicitud son trampas de GDF a menos que se indique lo contrario. En particular, la descripción demuestra que una trampa de GDF que es una forma soluble de un polipéptido ActRIIB que tiene un residuo ácido en la posición 79 del SEQ ID NO: 1, cuando se administra *in vivo*, aumenta los niveles de glóbulos rojos en la sangre. Por lo tanto, en ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para el uso de trampas de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en los pacientes y para tratar trastornos asociados con niveles bajos de glóbulos rojos o hemoglobina en pacientes que lo necesitan. Como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 12/012.652, las trampas de GDF se pueden usar para aumentar la masa muscular y reducir la masa grasa.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona trampas de GDF que son variantes de polipéptidos ActRIIB,

que incluyen polipéptidos ActRIIB que tienen truncamientos de los extremos amino y carboxiterminales y alteraciones de secuencia. Opcionalmente, las trampas de GDF de la descripción se pueden diseñar para antagonizar preferencialmente uno o más ligandos de receptores ActRIIB, tales como GDF8 (también denominado miostatina), GDF11, Nodal y BMP7 (también denominado OP-1). Los ejemplos de trampas de GDF incluyen un conjunto de
5 variantes derivadas de ActRIIB que tienen una afinidad por la activina sumamente disminuida. Estas variantes presentan efectos deseables en los glóbulos rojos, mientras reducen los efectos en otros tejidos. Los ejemplos de variantes de este tipo incluyen las que tienen un aminoácido ácido (por ejemplo, ácido aspártico, D, o ácido glutámico, E) en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1. En ciertos aspectos, el polipéptido de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la
10 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38, y polipéptidos que son por lo menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de lo anterior.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una trampa de GDF que se une a un ligando de ActRIIB tal como GDF8, GDF11, activina (por ejemplo, activina B), BMP7 o nodal y un
15 vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la trampa de GDF se une a un ligando de ActRIIB con una Kd de menos de 10 micromolar, menos de 1 micromolar, menos de 100 nanomolar, menos de 10 nanomolar o menos de 1 nanomolar. Opcionalmente, la trampa de GDF inhibe la señalización de ActRIIB, tal como acontecimientos de transducción de señales intracelulares desencadenados por un ligando de ActRIIB. Una trampa de GDF para su uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de las descritas en esta solicitud, que incluyen, por ejemplo,
20 trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:
25 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 donde la posición correspondiente a L79 en el SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido. Una trampa de GDF preferida para su uso en una preparación de este tipo consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 26. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de entre los SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 o una secuencia del SEQ ID NO: 2, que
30 carece del extremo C-terminal 1, 2, 3, 4, 5 o de 10 a 15 aminoácidos y que carece de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo N. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento con respecto al SEQ ID NO: 2 o 40 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N-terminal y de no más de 3 aminoácidos en el extremo C-terminal. Una trampa de GDF puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) con respecto a un polipéptido ActRIIB de origen natural. La alteración en la secuencia de
35 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 ActRIIB de origen natural.

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

y/o C se pueden unir a la porción B a través de una secuencia conectora.

Opcionalmente, una trampa de GDF incluye una variante del polipéptido ActRIIB que tiene 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 con un resto lipídico y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico. Una preparación farmacéutica puede incluir también uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado con ActRIIB. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una trampa de GDF se pueda expresar en una línea celular de mamífero que media la glucosilación natural de forma adecuada de la trampa de GDF para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Las líneas celulares humanas y CHO se han usado con éxito, y se espera que otros vectores de expresión de mamíferos comunes sean útiles.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona productos farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en esta solicitud y etiquetada para su uso en el aumento de los niveles de glóbulos rojos en un ser humano.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona trampas de GDF que son polipéptidos de ActRIIB solubles que comprenden un dominio de unión a ligando (por ejemplo, de unión a GDF8) 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 al SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una mayor selectividad para un ligando de este tipo tal como GDF8/GDF11 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. A modo de ilustración, estas mutaciones se demuestran en esta solicitud para aumentar la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF-11 (y, por lo tanto, presumiblemente, GDF8) sobre la activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto contrario, aumentan la relación de la unión a activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) se puede aumentar mediante la inclusión de la región de "cola" o, presumiblemente, de una región conectora no estructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que provocaron una disminución global en la afinidad de unión a ligando incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se pueden combinar para lograr los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan a la relación de la unión de GDF11:activina tienen un efecto negativo sobre la unión al ligando y, por lo tanto, se pueden combinar con mutaciones que aumentan en general la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad del ligando. En un aspecto ejemplar, una trampa de GDF es un polipéptido ActRIIB que comprende una mutación L79D o L79E, opcionalmente, en combinación con sustituciones, adiciones o supresiones aminoacídicas adicionales.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación entre K_d para unión a activina y K_d para unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o, incluso, 100 veces mayor 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 entre IC_{50} para inhibir la activina e IC_{50} para inhibir GDF8/GDF11 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor con respecto al dominio de unión al ligando de ActRIIB de tipo natural. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con una IC_{50} al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menor que la IC_{50} para la inhibición de la activina. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (ya sea de tipo natural o mutante). En ciertos casos, las trampas de GDF solubles en cuestión son antagonistas (inhibidores) de GDF8 y/o GDF11.

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

- la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 del SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de la trampa de GDF anterior, donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 del SEQ ID NO: 1 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 del SEQ ID NO: 1 o 39. Sorprendentemente, las construcciones que comienzan en los 22-25 del SEQ ID NO: 1 o 39 tienen mayores niveles de actividad que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. En un aspecto preferido, la proteína de fusión de la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 del SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en la posición de aminoácido 131 del SEQ ID NO: 1 o 39. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la trampa de GDF consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. Cualquiera de las proteínas de fusión de la trampa de GDF anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de la trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de las proteínas de fusión de la trampa de GDF anteriores puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1, opcionalmente, en combinación con una o más sustituciones, deleciones o inserciones aminoacídicas adicionales con respecto al SEQ ID NO: 1.
- 35 Se contemplan otras proteínas de la trampa de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de la trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1 o 39, donde la posición correspondiente a 64 del SEQ ID NO: 1 es un R o K, y donde la proteína de la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo en células aisladas. La proteína de la trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia del SEQ ID NO: 1 o 39 se sitúa fuera del sitio de unión a ligando. La proteína de la trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia del SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora situada dentro del sitio de unión a ligando. La proteína de la trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia del SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La proteína de la trampa de GDF anterior, 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 del sitio de unión a ligando.
- Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de la trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de los aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1 o 39, 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 del sitio de unión a ligando. La trampa de GDF anterior, donde la proteína de la trampa de GDF comprende un N en la posición correspondiente a la posición 24 del SEQ ID NO: 1 o 39 y un S o T en la posición correspondiente a la posición 26 del SEQ ID NO: 1 o 39, y donde la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo en células aisladas. La trampa de GDF anterior, donde la proteína de la trampa de GDF comprende un R o K en la posición correspondiente a la posición 64 del SEQ ID NO: 1 o 39. La trampa de GDF anterior, donde la proteína de ActRIIB comprende un D o E en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1 o 39 y donde la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo en células aisladas. La trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia del SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora situada dentro del sitio de unión a ligando. La trampa de GDF anterior, donde al menos una alteración con respecto a la secuencia del SEQ

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

En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido de la trampa de GDF soluble, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB que tiene una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría todo o parte del dominio transmembrana y/o del dominio citoplásmico de un polipéptido ActRIIB, pero para un codón de terminación situado dentro del dominio transmembrana o del dominio citoplásmico, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o el dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica una trampa de GDF puede comprender una secuencia completa de polinucleótidos de ActRIIB tal como el SEQ ID NO: 4 que tiene una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, dicho polinucleótido aislado comprende además un codón de terminación de la transcripción de al menos seis cientos nucleótidos antes del extremo 3' o, de otro modo, situado de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente a una porción truncada de un ActRIIB completo. Los ácidos nucleicos descritos en esta solicitud se pueden unir de forma operativa a un promotor para expresión, y la descripción proporciona células transformadas con polinucleótidos recombinantes de este tipo. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para preparar un polipéptido de la trampa de GDF. Un procedimiento de este tipo puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31) descrito en esta solicitud en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Un procedimiento de este tipo puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de la trampa de GDF, donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de la trampa de GDF; y b) recuperar el polipéptido de la trampa de GDF así expresado. Los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden recuperar como fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas conocidas para la obtención de proteínas a partir de cultivos celulares.

En ciertos aspectos, un polipéptido de la trampa de GDF descrito en esta solicitud se puede usar en un procedimiento para favorecer la producción de glóbulos rojos o para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para tratar un trastorno asociado con recuentos bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina (por ejemplo, anemia) o para favorecer la producción de glóbulos rojos en pacientes que lo necesitan. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un polipéptido de la trampa de GDF. En ciertos aspectos, la descripción proporciona usos de polipéptidos de la trampa de GDF para preparar un medicamento para tratar un trastorno o afección como se describe en esta solicitud.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona procedimientos para administrar un polipéptido de la trampa de GDF a un paciente. En parte, la descripción demuestra que los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina. Los polipéptidos de la trampa de GDF también se pueden usar para tratar o prevenir otros usos terapéuticos, tales como la promoción del crecimiento muscular. En ciertos aspectos, cuando se administra un polipéptido de la trampa de GDF para favorecer el crecimiento muscular, puede ser deseable monitorizar los efectos en los glóbulos rojos durante la administración del polipéptido de la trampa de GDF, o determinar o ajustar la dosificación del polipéptido de la trampa de GDF, para reducir los efectos no deseados en los glóbulos rojos. Por ejemplo, un aumento en los niveles de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina o niveles de hematocritos puede provocar un aumento en la presión arterial. La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La patente o solicitud contiene al menos un dibujo en color. Si se solicitara, y luego de efectuado el pago de la tasa necesaria, la oficina entregará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con el o los dibujos en color.

La figura 1 muestra un alineamiento de los dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 15) y ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) con los residuos que se deducen en esta solicitud, basada en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para entrar en contacto directamente con un ligando (el sitio

de unión a ligando) indicado con recuadros.

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

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos completa para el ActRIIB de la trampa GDF (L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), que incluye la secuencia líder de APT (doble subrayado), el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en el SEQ ID NO: 1; subrayado) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia natural tiene doble subrayado y está resaltado, al igual que la glicina se expone mediante la secuenciación del residuo del extremo N-terminal en la proteína de fusión madura.

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

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos para el ActRIIB truncado de la trampa de GDF (L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 26), que incluye la secuencia líder de APT (doble subrayado), el dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en el SEQ ID NO: 1; subrayado) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia natural tiene doble subrayado y está resaltado, al igual que el glutamato se pone de manifiesto mediante la secuenciación del residuo del extremo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. El SEQ ID NO: 27 corresponde a la hebra de sentido y el SEQ ID NO: 34 corresponde a la hebra de antisentido. La secuencia líder de APT (nucleótidos 1-66) tiene doble subrayado 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 en el SEQ ID NO: 1).

La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos para el ActRIIB truncado de la trampa de GDF (L79D 25-131)-hFc sin una secuencia líder (SEQ ID NO: 28). El dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en el SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia natural tiene doble subrayado y está resaltado, al igual que el glutamato se pone de manifiesto mediante la secuenciación del residuo del extremo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos para el ActRIIB truncado de la trampa de GDF (L79D 25-131) sin la secuencia líder, dominio hFc ni conector (SEQ ID NO: 29). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia natural está subrayado y resaltado, al igual que el glutamato se pone de manifiesto mediante la secuenciación del residuo del extremo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. El SEQ ID NO: 30 corresponde a la hebra de sentido y el SEQ ID NO: 35 corresponde a la hebra de antisentido. La secuencia líder de APT (nucleótidos 1-66) tiene doble subrayado, el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos natural del dominio extracelular tienen doble subrayado y están resaltadas (comparar con el SEQ ID NO: 27, figura 6). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en el SEQ ID NO: 1).

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

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

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

La figura 13 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los niveles de glóbulos rojos (GR), hemoglobina (HGB) y hematocritos (HCT) en un modelo de ratón nefrectomizado unilateralmente (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son la media de los cambios desde el valor inicial durante 4 semanas (\pm EEM). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ frente al NEPHX de control. Esta trampa de GDF impidió que la disminución asociada a la nefrectomía en estos parámetros eritrocitarios, al aumentar cada uno por una magnitud similar a la de los ratones con el riñón intacto (de referencia).

La figura 14 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los niveles de glóbulos rojos (GR) en un modelo de rata de anemia inducida por hemorragia aguda. La extracción de sangre se produjo en el día -1, con dosificación en los días 0 y 3. Los datos son medias \pm EEM. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ frente al vehículo en el mismo punto temporal. Esta trampa de GDF mejoró la velocidad y el grado de recuperación de la anemia inducida por hemorragia aguda.

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

La figura 16 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (negro) en el cambio absoluto en los hematocritos desde el valor inicial en el macaco cangrejero. VEH = vehículo. Los datos son medias \pm EEM. $n = 4-8$ por grupo.

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

La figura 18 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (negro) en el cambio absoluto en la concentración de reticulocitos circulantes desde el valor inicial en el macaco cangrejero. VEH = vehículo. Los datos son medias \pm EEM. $n = 4-8$ por grupo.

La figura 19 muestra el efecto del tratamiento combinado con eritropoyetina (EPO) y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas en los hematocritos 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 de la t para datos independientes) se designan con letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó los hematocritos en un 23 % con respecto al vehículo, un aumento sinérgico mayor que la suma de los efectos separados de EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc.

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

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

La figura 22 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas en las cifras 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 con letras diferentes. Mientras que la EPO sola aumentó la cifra de eritroblastos basófilos (BasoE) de manera espectacular a expensas de la maduración de precursores de etapa tardía, el tratamiento combinado aumentó las cifras de BasoE en menor medida pero aún de manera significativa, a la vez que respaldaba la maduración sin disminuir de precursores de etapa tardía.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Visión general

La EPO es una hormona glucoproteica involucrada en el crecimiento y maduración de células progenitoras eritroides en eritrocitos. El hígado produce la EPO durante la vida fetal y el riñón durante la vida adulta. Una producción disminuida de EPO, lo que comúnmente se produce en adultos como consecuencia de insuficiencia renal, lleva a anemia. La EPO se ha producido por técnicas de ingeniería genética basadas en la expresión y secreción de la proteína a partir de una célula huésped transfectada con el gen de EPO. La administración de una EPO recombinante de este tipo 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 la activación de, un receptor de superficie celular que pertenece a la superfamilia de receptores de la citocina y designado como receptor de la EPO. Los receptores de la EPO humana y murina se han clonado y expresado (D'Andrea y col., 1989, Cell 57:277; Jones y col., 1990, Blood 76:31; Winkelman y col., 1990, Blood 76:24; la publicación internacional WO 90/08822, la patente estadounidense n.º 5.278.065). El gen del receptor de la EPO humana codifica una proteína transmembrana de 483 aminoácidos que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 224 aminoácidos y que presenta aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el receptor de la EPO murina (véase la patente estadounidense n.º 6.319.499). El receptor de la EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamífero (66-72 kDa) se une a la EPO con una afinidad ($K_D = 100-300$ nM) similar a la del receptor natural en células progenitoras eritroides. Por tanto, se cree que esta forma contiene el principal determinante de unión a EPO y se denomina el receptor de la EPO. Por analogía con otros receptores de citocinas relacionados estrechamente, se cree que el receptor de la EPO dimeriza tras la unión del agonista. No obstante, la estructura detallada del receptor de la EPO, que puede ser un complejo multimérico, y su mecanismo específico de activación no se entienden completamente (patente estadounidense n.º 6.319.499).

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

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

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

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Estas proteínas se conocen por ejercer efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procedimientos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y las TGF-beta/activina/BMP10, cuyos miembros tienen diversos efectos, a menudo complementarios. Mediante la manipulación de 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 con pérdida de función en el gen de GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un aumento marcado en la masa muscular. Grobet y col., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en los seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 se asocian con un aumento de la masa muscular y, según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke y col., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

5

Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de los receptores de la serina/treonina cinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan aguas abajo las proteínas Smad tras la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana

10

y un dominio citoplasmático con especificidad serina/treonina prevista. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización. Se requieren los receptores de tipo II para la unión de ligandos y para la expresión de los receptores de tipo I. Los receptores de la activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión al ligando, lo que da lugar a la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II.

15

Dos receptores de tipo II (ActRII) relacionados, ActRIIA y ActRIIB, se han identificado como los receptores de tipo II para las activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano y col., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con otras diversas proteínas de la familia TGF- β , que incluyen BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita y col., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yco y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh y col., 2002, Genes Dev. 16:2749-

20

54). ALK4 es el receptor principal de tipo I para las activinas, en particular, para la activina A, y ALK-7 puede cumplir también la función como receptor para las activinas, en particular, para la activina B. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a antagonizar un ligando de los receptores de ActRIIB (también denominados ligando de ActRIIB) con un polipéptido de la trampa de GDF objeto. Los ejemplos de ligandos de receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia de TGF- β , tales como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7.

25

La activinas son factores de crecimiento de polipéptidos dimericos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β 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 β_C o β_E .

30

En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células ováricas y placentarias, respaldar la supervivencia de las células neuronales, influir en el desarrollo del ciclo celular de forma positiva o negativa 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; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Por otra parte, se ha descubierto

35

que el factor de diferenciación eritroide (FDE) aislado de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas es idéntico a la activina A (Murata y col., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha apuntado a que la activina A favorece la eritropoyesis en la médula ósea. En diversos tejidos, la señalización de la activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) de la pituitaria, la activina favorece la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina impide la secreción y síntesis

40

de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen follistatina (FS), proteína relacionada con la follistatina (FSRP) y α_2 -macroglobulina.

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación del mesodermo y endodermo, así como en la organización posterior de las estructuras axiales tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana.

45

Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la placa notocordal y precortical, mientras que recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar tanto a través de receptores de tipo I como de tipo II y de los efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Los estudios recientes respaldan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma y col., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Se apunta a que los

50

ligandos de Nodal interactúan con sus cofactores (por ejemplo, cripto) para activar los receptores de la activina de tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos acontecimientos cruciales para el embrión de vertebrado precoz, que incluyen la formación del mesodermo, patrón anterior y especificación del eje

55

izquierda-derecha. Las pruebas experimentales han demostrado que la señalización de Nodal activa pAR3-Lux, un reportero de luciferasa que se demostró previamente que respondía específicamente a la activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir pTlx2-Lux, un reportero específicamente sensible a proteínas morfogenéticas

óseas. Los resultados recientes proporcionan pruebas bioquímicas directas de que la señalización de Nodal está mediada por la vía de la activina-TGF-beta Smads, Smad2 y Smad3. Otra prueba ha demostrado que se requiere la proteína cripto extracelular para la señalización de Nodal, por lo que es distinta a la señalización de activina o TGF-beta.

60

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 se expresa altamente en el músculo esquelético en desarrollo y adulto. La mutación anuladora de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una hipertrofia e hiperplasia marcadas del músculo esquelético (McPherron y col., *Nature*, 1997, 387:83-90). Los aumentos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones de origen natural de GDF8 en el ganado (Ashmore y col., 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland y Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron y Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; y Kambadur y col., *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en los seres humanos (Schuelke y col., *N Engl J Med* 2004;350:2682-8). Los estudios también han demostrado que la atrofia muscular asociada con infección por VIH en los seres humanos está acompañada de aumentos en la expresión de proteínas GDF8 (Gonzalez-Cadavid y col., *PNAS*, 1998, 95:14938-43). Además, el GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, la creatina cinasa) y modular la proliferación celular de mioblastos (WO 00/43781). El péptido de GDF8 se puede unir de forma no covalente al dímero del dominio de GDF8 maduro, al inactivar su actividad biológica (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 a GDF8 o relacionadas estructuralmente con las proteínas y que inhiben su actividad biológica incluyen follistatina y, potencialmente, proteínas relacionadas con follistatina (Gamer y col. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232).

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 GDF-11 se expresa en el brote de la cola, brote de las extremidades, arcos maxilares y mandibulares y ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima y col., 1999, *Mech. Dev.* 80: 185-189). El GDF-11 desempeña un papel único en la formación del patrón tanto del tejido mesodérmico como del neural (Gamer y col., 1999, *Dev Biol.*, 208:222-32). El GDF11 demostró ser un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de las extremidades de polluelos (Gamer y col., 2001, *Dev Biol.* 229:407-20). La expresión de GDF11 en el músculo también apunta a su papel en la regulación del crecimiento muscular de una manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro apunta a que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se encontró que el GDF-11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu y col., 2003, *Neuron*. 37:197-207). Por lo tanto, el GDF-11 puede tener aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

La proteína morfogenética ósea (BMP7), también denominada proteína osteogénica 1 (OP-1), es conocida por inducir la formación de cartílagos y huesos. Además, la BMP7 regula una gran variedad de procesos fisiológicos. Por ejemplo, la BMP-7 puede ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se descubrió que la BMP7 desempeña un papel 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 complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor de tipo I BMP7 observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). La BMP7 y la activina provocaron respuestas biológicas distintas y activaron diferentes vías de Smad (Macias-Silva y col., 1998, *J Biol Chem.* 273:25628-36).

Como se ha demostrado en esta solicitud, un polipéptido de la trampa de GDF, que es una variante del polipéptido ActRIIB (ActRIIB), es más efectivo en el aumento de los niveles de glóbulos rojos *in vivo* en comparación con un polipéptido ActRIIB soluble de origen natural y tiene efectos beneficiosos en una variedad de modelos para anemias. Además, se ha demostrado que el uso de un polipéptido de la trampa de GDF en combinación con un activador del receptor de la EPO provoca un aumento sustancial en la formación de glóbulos rojos. Cabe señalar que la hematopoyesis es un procedimiento complejo, regulado por una variedad de factores, que incluyen la eritropoyetina, G-CSF y homeostasis del hierro. Las expresiones "aumentar los niveles de glóbulos rojos" y "favorecer la formación de glóbulos rojos" se refieren a las métricas clínicamente observables, tales como los recuentos de hematocritos, glóbulos rojos y las mediciones de hemoglobina, y se pretenden que sean neutros en cuanto al mecanismo por el cual se producen cambios de este tipo.

Además de estimular los niveles de glóbulos rojos, los polipéptidos de la trampa de GDF son útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, favorecer el crecimiento muscular (véanse las publicaciones PCT n.º WO 2006/012627 y WO 2008/097541).

En ciertos aspectos, cuando se administra un polipéptido de la trampa de GDF con el propósito de aumentar músculo, puede ser deseable reducir o minimizar los efectos sobre los glóbulos rojos. Mediante el control de diversos parámetros hematológicos en pacientes en tratamiento con, o que son candidatos para el tratamiento con, un polipéptido de la trampa de GDF, la dosificación apropiada (que incluye las cantidades y la frecuencia de administración) se puede determinar en función de las necesidades de cada paciente, los parámetros hematológicos iniciales y el propósito del tratamiento. Asimismo, el progreso terapéutico y los efectos sobre uno o más parámetros hematológicos en el tiempo

pueden ser útiles en la gestión de pacientes a los que se les ha dosificado un polipéptido de la trampa de GDF al facilitar la asistencia sanitaria, determinar una dosificación de mantenimiento apropiada (tanto cantidad como frecuencia), etc.

- 5 Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen en general sus significados normales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se analizan a continuación o en otra parte de la memoria descriptiva para proporcionar una guía adicional al médico de cabecera al describir las composiciones y 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 el término.

10 "Aproximadamente" significará en general un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados ejemplares de error dentro de un 20 por ciento (%), preferiblemente, dentro de un 10 % y, más preferiblemente, dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado de valores.

- 15 De forma alternativa y en sistemas biológicos en particular, el término "aproximadamente" puede significar valores que se encuentran dentro de un orden de magnitud, preferiblemente, dentro de 5 veces y, más preferiblemente, dentro de 2 veces un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en esta solicitud son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indique expresamente.

- 20 Los procedimientos de la descripción pueden incluir etapas para comparar secuencias entre sí, que incluyen secuencia de tipo natural de uno o más mutantes (variantes de secuencia). Las comparaciones de este tipo comprenden típicamente alineamientos de secuencias poliméricas, por ejemplo, al usar programas y/o algoritmos de alineamiento de secuencias que son conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que, en los alineamientos de este tipo, donde una mutación contiene una inserción o deleción de residuos, el alineamiento de secuencias introducirá un "hueco" (normalmente representado por un guion, o "A") en la secuencia polimérica que no contiene el residuo insertado o eliminado.

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

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

- 40 Sin embargo, en el uso común y en esta solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", se puede referir a similitud de secuencia y puede o no puede estar relacionado con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos de la trampa de GDF

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

- 55 Como se usa en esta solicitud, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de la activina de tipo IIb (ActRIIB) procedentes de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIB mediante mutagénesis u otra modificación. Con respecto a proteínas ActRIIB, en esta solicitud, se entiende que es una referencia a cualquiera de las formas identificadas en la actualidad. Los miembros de la familia de proteínas ActRIIB son en general proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región

rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad serina/treonina cinasa prevista. Las secuencias de aminoácidos del dominio soluble extracelular de ActRIIA humano (proporcionado para comparación) y del dominio extracelular soluble de ActRIIB se ilustran en la figura 1.

- 5 La expresión "polipéptido ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia de ActRIIB, así como variantes del mismo (que incluyen mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de una secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tiene una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB y,
- 10 opcionalmente, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o una identidad mayor. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede unir e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o activina. Un polipéptido ActRIIB que es una trampa de GDF se puede seleccionar para detectar actividad en la promoción de la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen el polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 y 39) y polipéptidos ActRIIB solubles humanos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). La numeración de
- 15 los ácidos nucleicos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en esta solicitud se basan en la numeración para SEQ ID NO:1, a menos que se designe específicamente lo contrario.

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

MTAPWVALALLWGSLPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**NSGLERC
E**GEQDKRLHCYASWR**N**SSGTIELVKKG****CWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERF**THLPEAGGPEVTYEPPTAPT****LLTVLAYSLLPIG**
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMND**FVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL**
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

20

El péptido señalizador tiene subrayado sencillo; el dominio extracelular está en negrita y los posibles sitios de glucosilación con enlaces N-glucosídicos están en recuadros.

- 25 También se documenta en la bibliografía, una forma con una alanina en la posición 64 que es la siguiente:

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERC
 EGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
 VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

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

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

5

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

10

En algunas condiciones, la proteína se puede producir con una secuencia "SGR ..." en el extremo N-terminal. La "cola" carboxiterminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EA (SEQ ID NO: 3)

15

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EA (SEQ ID NO: 41)

20

En algunas condiciones, la proteína se puede producir con una secuencia "SGR ..." en el extremo N. La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora ActRIIB humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de la entrada de GenBank NM_001 106) (la secuencia como se muestra proporciona una alanina en la posición 64 y se puede modificar para proporcionar una arginina en lugar)

25

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
 CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
 CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
 GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
 GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
 CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
 GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
 ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
 AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
 GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
 AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCCTCCACC
 ACCATCCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
 GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
 TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
 TGAACGGGAGATCTTACGACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
 CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
 GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
 TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
 GTTCGATTTGAGCCAGGGAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
 GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
 CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
 CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCAAGAAGATGAGGCCACCATTAAA
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
 CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

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

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC
 ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
 ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA
 GAGGCTGGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA
 CC (SEQ ID NO: 5)

- 5 En una realización específica, la invención se refiere a polipéptidos de la trampa de GDF que son formas variantes de polipéptidos ActRIIB solubles. Como se describe en esta solicitud, la expresión "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere en general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. La expresión "polipéptido ActRIIB soluble", como se usa en esta solicitud, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIB así como cualquier variante de la misma (que incluye mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y es en general soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles incluyen polipéptidos solubles ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 22, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, véase el ejemplo 1. La secuencia señal puede ser una secuencia señal natural de un ActRIIB, o una secuencia señal procedente de otra proteína, tal como una secuencia señal del activador tisular del plasminógeno (APT) o una secuencia señal de melitina de miel de abeja (HBM).

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

25 Attisano y col. (Cell. 10 de enero de 1992;68(1):97-108) demostraron que una delección del nudo de prolina en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor para activina. Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 del SEQ ID NO: 1, "ActRIIB (20-119)-Fc", ha reducido la unión a GDF-11 y a activina con respecto a una ActRIIB (20-134)-Fc, que incluye la región de nudo de prolina y el dominio 30 yuxtamembrana completo. Sin embargo, una proteína ActRIIB (20-129)-Fc conserva una actividad similar sino un poco reducida con respecto al tipo natural, incluso aunque se perturbe la región de nudo de prolina. Por tanto, los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 se espera que estén todos activos, pero las construcciones que se detienen en 134 o 133 pueden estar más activas. De forma similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por un margen 35 grande. Para respaldar esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, un polipéptido de la trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión reducida al ligando. El aminoácido 119 está mal conservado y, por tanto, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o más adelante conservan la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en 40 o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Puede ser deseable el uso de cualquiera de estas formas, en función de la situación clínica o experimental.

En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes conserve la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación alanina a asparagina en 45 la posición 24 introduce una secuencia de glucosilación con enlaces N-glucosídicos sin afectar sustancialmente a la unión al ligando. Esto confirma que se toleran bien las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señalizador y la región reticulada de la cisteína, que se corresponde con los aminoácidos 20-29. En particular, se espera también que las construcciones que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 conserven su actividad, y las construcciones que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 conserven la actividad. Los datos mostrados en los ejemplos 50 demuestran que, sorprendentemente, una construcción que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

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

La descripción incluye los resultados de un análisis de estructuras compuestas de ActRIIB, mostradas en la figura 1, lo que demuestra que el sitio de unión a ligando se define 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 las mutaciones R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es un K en *Xenopus*, lo que indica que se tolerarán los aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus* y, por lo tanto, se tolerarán los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H en esta posición. Por tanto, una fórmula general para una proteína de la trampa de GDF que comprende los aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1 o 39, pero que comienzan opcionalmente en una posición que oscila de 20-24 o 22-25 y que terminan en una posición que oscila de 129-134, y que comprenden no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el sitio de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el sitio de unión a ligando. Una proteína de este tipo puede conservar más de un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1 o 39. Los sitios fuera del sitio de unión, en los que se puede tolerar particularmente bien la variabilidad, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se indicó anteriormente) y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) mejora en realidad la unión al ligando en el fondo de A64 y, por tanto, se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión al ligando en el fondo de R64. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el fondo de A64, lo que demuestra 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.

ActRIIB se conserva bien a través de casi todos los vertebrados, con grandes extensiones de dominio extracelular conservadas por completo. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB se conservan altamente también. En consecuencia, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporciona una visión de los residuos que se pueden ser alterar. Por lo tanto, una variante del polipéptido ActRIIB humano activo útil como trampa de GDF puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIB de vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de otra secuencia humana o de otros vertebrados. Los siguientes ejemplos ilustran esta estrategia para definir una variante de ActRIIB activa. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus*, por lo que esta posición se puede alterar y, opcionalmente, se puede alterar a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo no polar tal como A. E52 es un K en *Xenopus*, lo que indica que este sitio puede ser tolerante a una amplia variedad de cambios, que incluye residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es un K en *Xenopus*, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, con residuos polares favorecidos, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es un 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, que incluyen D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que se toleran los residuos básicos en esta posición, que incluyen R y H. A en la posición 119 se conserva relativamente mal y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, por tanto, se debe tolerar esencialmente cualquier aminoácido en esta posición.

La descripción demuestra que la adición de otro sitio de glucosilación con enlaces N-glucosídicos (N-X-S/T) aumenta la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, con respecto a la forma ActRIIB (R64)-Fc. Mediante la introducción de una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia de NXT que confiere una semivida más larga. Se encontraron otras secuencias de NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque los

últimos pueden no glucosilarse eficientemente con el R en la posición 64. Las secuencias de N-X-S/T se pueden introducir en general en posiciones fuera del sitio de unión a ligando definido en la figura 1. Los sitios especialmente adecuados para la introducción de secuencias de N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. Las secuencias de N-X-S/T también se pueden introducir en el conector entre la secuencia de ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Se puede introducir un sitio de este tipo con el mínimo esfuerzo mediante la introducción de un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o mediante la introducción de un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por tanto, las alteraciones deseables que crearía un sitio de glucosilación con enlaces N-glucosídicos son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinada con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se predice que está glucosilado se puede alterar a un T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección permitida por la glucosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que está glucosilado se puede alterar a un S. Por tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Del mismo modo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. En consecuencia, una trampa de GDF puede ser una variante de ActRIIB que tiene una o más secuencias de consenso de glucosilación con enlaces N-glucosídicos no endógenas adicionales.

La posición L79 de ActRIIB se puede alterar para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D conserva la unión a GDF-11. De forma notable, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión a activina. Los experimentos *in vivo* indican que estos receptores que no son de activina conservan una capacidad significativa para aumentar los glóbulos rojos, pero muestran efectos disminuidos en otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad para obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina. En aspectos ejemplares, los procedimientos descritos en esta solicitud usan un polipéptido de la trampa de GDF que es una variante del polipéptido ActRIIB que comprende un aminoácido ácido (por ejemplo, D o E) en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1 o 39, opcionalmente, en combinación con una o más sustituciones, adiciones o delecciones aminoacídicas adicionales.

Las variaciones descritas se pueden combinar de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descritos en esta solicitud indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que a menudo es beneficioso conservarlas. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), posición 78 (hidrófobo y, en particular, triptófano), posición 37 (ácido y, en particular, ácido aspártico o glutámico), posición 56 (aminoácido básico), posición 60 (aminoácido hidrófobo, en particular, fenilalanina o tirosina). Así, en cada una de las variantes descritas 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 cargada, en particular, E, D, R o K).

En ciertos aspectos, se pueden obtener fragmentos aislados de polipéptidos ActRIIB mediante cribado de polipéptidos producidos de forma recombinante procedentes del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y 5). Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como la técnica en fase sólida de Merrifield o las técnicas químicas f-Moc o t-Boc convencionales. Los fragmentos se pueden producir (de forma recombinante o por síntesis química) y someter a prueba para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando de ActRIIB.

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

En ciertos aspectos, la presente descripción contempla preparar variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido de la trampa de GDF para dichos propósitos como mejorar la eficiencia terapéutica o estabilidad (por ejemplo, semivida *ex vivo* o resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden producir también mediante sustitución, delección o adición aminoacídica. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente

(por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que se llevan a cabo dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados respecto a sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la trampa de GDF da lugar a una variante funcional, se puede determinar fácilmente mediante la

- 5 evaluación de la capacidad del polipéptido de la trampa de GDF para producir una respuesta en las células con respecto al polipéptido de la trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo natural, o para unirse a uno o más ligandos, tales como la activina, GDF-11 o miostatina en comparación con el polipéptido de la trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo natural.
- 10 En ciertos aspectos específicos, la presente descripción contempla realizar mutaciones en el dominio extracelular (también denominado como dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB, de modo que el polipéptido ActRIIB tenga actividades de unión a ligando (por ejemplo, afinidad de unión o especificidad de unión) alteradas. En ciertos aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF de este tipo tienen afinidad de unión alterada (elevada o reducida) para un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos de la trampa de GDF tienen especificidad de unión alterada

15 Por ejemplo, la descripción proporciona polipéptidos de la trampa de GDF que se unen preferiblemente a GDF8/GDF11 con respecto a las activinas. La descripción establece además la conveniencia de los polipéptidos de este tipo para reducir los efectos inespecíficos, aunque las variantes selectivas de este tipo pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves, donde pueden ser necesarias ganancias muy grandes en los niveles de glóbulos rojos para el efecto terapéutico y donde es deseable un cierto nivel de efecto inespecífico. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, están en el sitio de unión a ligando y median la unión a sus ligandos, tales como la activina y GDF8. Por tanto, la presente descripción proporciona una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando (por ejemplo, dominio de

20 unión a GDF8) 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 una mayor selectividad para un ligando de este tipo tal como GDF8 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando para GDF8 sobre la activina. Opcionalmente, un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación entre K_d para unión a activina y K_d para

25 unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o, incluso, 100 veces mayor 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 entre IC_{50} para inhibir la activina e IC_{50} para inhibir GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor con respecto al dominio de unión al ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8 con una IC_{50} al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menor que la IC_{50} para la inhibición de la activina.

30 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 la trampa de GDF que se une preferencialmente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de

35 aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como otro ejemplo específico, el residuo hidrófobo, L79, se puede alterar a los aminoácidos ácidos aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión a activina mientras se conserva la unión a GDF11. Como reconocerá un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas se pueden realizar a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraduccional o síntesis química. Las secuencias de este tipo se conocen en la técnica.

40 En ciertos aspectos, la presente descripción contempla polipéptidos de la trampa de GDF que tienen mutaciones específicas en ActRIIB para alterar la glucosilación del polipéptido ActRIIB. Los sitios de glucosilación ejemplares en polipéptidos de la trampa de GDF se ilustran en la figura 1 (por ejemplo, los sitios NX(S/T) subrayados). Las mutaciones de este tipo se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como

45 sitios de glucosilación con enlaces O-glucosídicos o N-glucosídicos. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unidos a asparagina comprenden en general una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que reconoce específicamente enzimas de glucosilación celular apropiadas. La modificación también se puede realizar mediante la adición, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo natural (para sitios de glucosilación con enlaces O-glucosídicos). Una

50 variedad de sustituciones o deleciones aminoacídicas en una o ambas de las primeras y segundas posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) da lugar a la ausencia de glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en un polipéptido de la trampa de GDF es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido de la trampa de GDF. En función del modo de acoplamiento usado, el/los glúcido(s) se

55 puede(n) unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como aquellos de

- cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos, tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos procedimientos se describen en los documentos WO 87/05330 y Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La eliminación de uno o más restos de carbohidratos presentes en un polipéptido de la trampa de GDF se puede conseguir
- 5 de forma química y/o enzimática. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, exponer el polipéptido de la trampa de GDF al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la escisión de la mayor parte o de todos los glúcidos excepto el glúcido de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe además por Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge y col. (1981) Anal. Biochem. 118:131.
- 10 La escisión enzimática de restos de carbohidratos en los polipéptidos de la trampa de GDF se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura y col. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia del polipéptido de la trampa de GDF se puede ajustar, según sea apropiado, en función del tipo de sistema de expresión usado, ya que se pueden introducir células de mamífero, levadura, insectos o vegetales con patrones de glucosilación diferentes que se pueden ver afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido.
- 15 En general, los polipéptidos de la trampa de GDF para su uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glucosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamíferos sean útiles también.

- Esta descripción contempla además un procedimiento para generar variantes, en particular, conjuntos de variantes
- 20 combinatorias de un polipéptido de la trampa de GDF, que incluyen, opcionalmente, las variantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de la trampa de GDF. El propósito de cribar colecciones combinatorias de este tipo puede ser la de generar, por ejemplo, variantes del polipéptido de la trampa de GDF que tienen propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada o unión a ligando alterada. A continuación, se proporciona una variedad de ensayos de cribado, y se pueden usar los ensayos
- 25 de este tipo para evaluar las variantes. Por ejemplo, la variante del polipéptido de la trampa de GDF se puede cribar para determinar la capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIB, para impedir la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB o para interferir en la señalización provocada por un ligando de ActRIIB.

- La actividad de un polipéptido de la trampa de GDF o de sus variantes se puede someter a prueba también en un
- 30 ensayo en células aisladas o *in vivo*. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido de la trampa de GDF en la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Según sea necesario, esto se puede llevar a cabo en presencia de una o más proteínas del ligando de ActRIIB recombinantes (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido de la trampa de GDF y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRIIB. Del mismo modo, se puede administrar un polipéptido de la trampa de GDF a un ratón u otro
- 35 animal y se pueden evaluar una o más mediciones de sangre, tales como un recuento de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina, niveles de hematocritos, reservas de hierro o recuento de reticulocitos usando procedimientos reconocidos en la técnica.

- Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva con respecto a un
- 40 polipéptido de la trampa de GDF de referencia. Las variantes de proteínas de este tipo, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, se pueden usar en protocolos de genoterapia. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes al polipéptido de la trampa de GDF no modificado correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que dan lugar a la destrucción o, de otro modo, la
- 45 inactivación de un polipéptido de la trampa de GDF no modificado. Las variantes de este tipo, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles del polipéptido de la trampa de GDF mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos de la trampa de GDF. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles del polipéptido de la trampa de GDF recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión
- 50 Fc, se pueden realizar mutaciones en el conector (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

- En ciertos aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF de la descripción pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos
- 55 ActRIIB. Las modificaciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de la trampa de GDF pueden contener elementos que no son aminoácidos, como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de los elementos que no son aminoácidos en la funcionalidad de un polipéptido de la trampa de GDF se pueden someter a prueba como se describe en esta solicitud para otras variantes del polipéptido de la trampa de GDF. Cuando se produce un polipéptido de la trampa de GDF en células mediante la escisión de una forma naciente del polipéptido de la trampa
- 60 de GDF, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de

la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen mecanismos celulares específicos y característicos para las actividades postraduccionales de este tipo y se pueden elegir para garantizar la modificación y procedimiento correctos de los polipéptidos de la trampa de GDF.

- 5 En ciertos aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de un polipéptido ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos conocidos de los dominios de fusión de este tipo incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad
- 10 deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para propósitos de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de las matrices de este tipo están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con compañeros de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un
- 15 dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de la trampa de GDF. Los ejemplos de los dominios de detección de este tipo incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como los "epítomos de identificación", que son normalmente secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Los epítomos de identificación conocidos para los que anticuerpos monoclonales específicos están disponibles fácilmente incluyen marcadores FLAG, marcadores de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y de c-myc.
- 20 En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, de este modo, libere 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 la trampa de GDF se funde con un dominio que estabiliza el polipéptido de la trampa de GDF *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se
- 25 entiende cualquier cosa que aumente la semivida sérica, independientemente de si esto se debe a una destrucción disminuida, aclaramiento disminuido por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Del mismo modo, las fusiones pueden conferir propiedades deseables a la seroalbúmina humana. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización)
- 30 y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional), tales como un aumento adicional en los niveles de glóbulos rojos.

Como ejemplo específico, la presente descripción proporciona una trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, de unión a ligando) del polipéptido ActRIIB fusionado

35 a un dominio Fc. La secuencia de un dominio Fc ejemplar se muestra a continuación (SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHN (A) HYTKQSLSLSPGK*

- Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en los residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434.
- 40 En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse a los receptores Fcγ con respecto a un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) tiene una capacidad aumentada para unirse al receptor Fc relacionado a la clase I de MHC (FcRN) en respecto a un dominio Fc de tipo natural.
- 45 Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF se puede situar en el extremo C-terminal con respecto a un dominio heterólogo, o, de forma alternativa, un dominio heterólogo se puede situar en el extremo C-terminal con respecto a un polipéptido de la trampa de GDF. El dominio del polipéptido de la
- 50 trampa de GDF y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios adicionales o secuencias de aminoácidos en el extremo C-terminal o N-terminal con respecto al dominio o entre los dominios.

En ciertos aspectos, una proteína de fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se

55 expone en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado en el extremo N-terminal y C-terminal

- que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 26-132 del SEQ ID NO: 26. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y las porciones A y C, cuando están presentes, son heterólogas a B. Las porciones A y/o C se pueden unir a la porción B a través de una secuencia conectora. Los conectores ejemplares incluyen conectores de polipéptidos cortos tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3
- 5 residuos de glicina, tales como, por ejemplo, un conector Gly-Gly-Gly. Otros conectores adecuados se describen anteriormente en esta solicitud. En ciertos aspectos, una proteína de fusión de la trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C, donde A es una secuencia líder, B consiste en los aminoácidos 26-132 del SEQ ID NO: 26 y C es una porción de polipéptido que mejora uno o más de entre
- 10 estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, absorción/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos de proteínas y/o purificación. En ciertos aspectos, una proteína de fusión de la trampa GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C, donde A es una secuencia líder de APT, B consiste en los aminoácidos 26-132 del SEQ ID NO: 26 y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión de la trampa de GDF preferida comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 26.
- 15 En ciertos aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF de la presente descripción contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de la trampa de GDF. Por ejemplo, las modificaciones de este tipo mejoran la semivida *in vitro* de los polipéptidos de la trampa de GDF, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos de la trampa de GDF o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de la trampa de GDF. Las modificaciones estabilizantes de este tipo incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por
- 20 ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de la trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (que incluyen, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido de la trampa de GDF) y modificaciones del resto de carbohidrato (que incluyen, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidratos de un polipéptido de la trampa de GDF). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido de la trampa de GDF se fusiona con un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio
- 25 Fc). Como se usa en esta solicitud, la expresión "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de carbohidrato o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

- En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de la
- 30 trampa de GDF, que se aíslan de o, de otro modo, están sustancialmente libres de, otras proteínas.

- En ciertos aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF (modificados o no modificados) de la descripción se pueden producir por una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos de la trampa de GDF de este tipo se pueden sintetizar usando técnicas de química de proteínas estándar, tales como aquellas descritas en
- 35 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, los sintetizadores de péptidos automatizados se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, Advanced Chemtech Modelo 396; Milligen/Bioscience 9600). De forma alternativa, los polipéptidos de la trampa de GDF, fragmentos o variantes de los mismos se pueden producir de forma recombinante usando diversos sistemas de expresión (por ejemplo, E. coli,
- 40 células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus), como se conoce en la técnica. En un aspecto adicional, los polipéptidos de la trampa de GDF modificados o no modificados se pueden producir mediante digestión de polipéptidos de la trampa de GDF de longitud completa producidos de forma recombinante mediante el uso de, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, enzima de conversión de aminoácidos básicos emparejados (PACE). Se puede usar análisis por ordenador (usando un software disponible comercialmente, por
- 45 ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar los sitios de escisión proteolítica. De forma alternativa, los polipéptidos de la trampa de GDF de este tipo se pueden producir a partir de polipéptidos de la trampa de GDF de longitud completa producidos de forma recombinante tales como técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mediante escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

50 3. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la trampa de GDF

- En ciertos aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos de la trampa de GDF descritos en esta solicitud. SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor ActRIIB de origen natural, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica un polipéptido ActRIIB soluble y SEQ ID NO: 25, 27,
- 55 30 y 31 codifican trampas de GDF solubles. Los ácidos nucleicos objetivo pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los ácidos nucleicos de este tipo pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en procedimientos para preparar polipéptidos de la trampa de GDF o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en una estrategia de genoterapia).

- 60 En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos objetivo que codifican los polipéptidos de la trampa

de GDF incluyen ácidos nucleicos que son variantes de los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31. Las variantes de secuencias de nucleótidos incluyen secuencias que difieren por una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas: y, por lo tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante designada en los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31.

5

En ciertos aspectos, la descripción proporciona secuencias de ácidos nucleicos aislados o recombinantes que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31. Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31 y las variantes de los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31 se encuentran también dentro del alcance de esta descripción.

10 En otros aspectos, las secuencias de ácido nucleico 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 descripción también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente restrictivas con la secuencia de nucleótidos designada en los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31,

15 la secuencia de complemento de los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31 o fragmentos de los mismos. Como se analizó anteriormente, un experto en la técnica entenderá fácilmente que las condiciones de restricción apropiadas que favorecen la hibridación del ADN 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 por un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja restricción de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C hasta una alta restricción de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar de condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de alta restricción a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras se cambia la otra variable. En un aspecto, la descripción proporciona ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones de restricción bajas de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido por un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se expone en los SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31 debido a la degeneración en el código genético también se encuentran dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, diversos aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar lugar a mutaciones "imperceptibles" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. En ciertos aspectos, el polipéptido de la trampa de GDF se codificará por una secuencia de nucleótidos alternativa. Las secuencias de nucleótidos alternativas se degeneran con respecto a la secuencia de ácido nucleico de la trampa de GDF natural, pero todavía codifican la misma proteína de fusión. En ciertos aspectos, la trampa de GDF que tiene el SEQ ID NO: 26 se codifica por una secuencia de ácido nucleico alternativa que comprende el SEQ ID NO: 30. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que provocan 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 un 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 las variaciones de nucleótidos de este tipo y polimorfismos de aminoácidos resultantes se encuentran dentro del alcance de esta descripción.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos recombinantes de la descripción se pueden unir operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. En general, las secuencias de nucleótidos reguladoras serán apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación traduccionales, secuencias de inicio y terminación de transcripción 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 un aspecto preferido, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son conocidos en la técnica y variarán en función de la célula huésped usada.

En ciertos aspectos de la descripción, el ácido nucleico objetivo se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la trampa de GDF y unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras se reconocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de la trampa de GDF. En consecuencia, la expresión secuencia reguladora incluye

60

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 una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a la misma en estos vectores para expresar

5 secuencias de ADN que codifican un polipéptido de la trampa de GDF. Las secuencias de control de la expresión útiles de este tipo 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 ARN polimerasa T7, las principales regiones promotoras y

10 operadoras del fago lambda, las regiones de control de la proteína de la envoltura de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura, el promotor del poliedro del sistema del 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 huésped que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea

15 expresar. Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores de antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante de la descripción ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero)

20 o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de la trampa de GDF recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, como *E. coli*.

25 Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como

30 pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en eucariotas. De forma alternativa, 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 (que incluyen los retrovíricos) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de genoterapia. Los diversos procedimientos

35 empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores se conocen en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2.^a edición, ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) capítulos 16 y 17. En algunos aspectos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de

40 baculovirus. Los ejemplos de sistemas de expresión de baculovirus de este tipo incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (como el β -gal que contiene pBlueBac III).

En un aspecto preferido, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo

45 en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, California, EE. UU.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) y Vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.). Como resultará evidente, las construcciones de genes objetivo se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos de la trampa de GDF en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, que incluyen proteínas de fusión o variantes de proteínas, para purificación.

50 Esta descripción se refiere también a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 o 31) para uno o más de los polipéptidos de la trampa de GDF objeto. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF de la descripción se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por

55 ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), células de levadura o de mamífero. Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

En consecuencia, la presente descripción se refiere además a procedimientos de producción de los polipéptidos de la trampa de GDF objeto. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un

60 polipéptido de la trampa de GDF se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la

expresión del polipéptido de la trampa de GDF. El polipéptido de la trampa de GDF se puede secretar y aislar de una mezcla de células y un medio que contiene el polipéptido de la trampa de GDF. De forma alternativa, el polipéptido de la trampa de GDF se puede conservar citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular se conocen en la técnica. Los polipéptidos de la trampa de GDF objetivo se pueden aislar del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de la trampa de GDF. En un aspecto preferido, el polipéptido de la trampa de GDF es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

En otro aspecto un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido de la trampa de GDF recombinante puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina de metal Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido de la trampa de GDF purificado (por ejemplo, véase Hochuli y col., (1987) J. Chromatography 411:177 y Janknecht y col., PNAS EE. UU. 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión se conocen. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos con terminales romos o terminales irregulares para la fijación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y fijación enzimática. En otro aspecto, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. De forma alternativa, la amplificación mediante PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente se pueden hibridar para generar una secuencia de genes químicos (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons: 1992).

4. Ensayos de cribado

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

Hay numerosas estrategias para el cribado de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina mediante el direccionamiento de la señalización de ActRIIB. En ciertos aspectos, el cribado de alta capacidad de compuestos se puede llevar a cabo para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB en una línea celular seleccionada. En ciertos aspectos, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben específicamente o reducen la unión de un polipéptido ActRIIB a su compañero de unión, tal como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). De forma alternativa, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIB a su compañero de unión tal como un ligando de ActRIIB. En un aspecto adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente descripción, aquellos que no se describen expresamente en esta solicitud se comprenderán sin embargo por un experto en la técnica. Como se describe en esta solicitud, los compuestos de prueba (agentes) de la descripción se pueden crear mediante cualquier procedimiento químico combinatorio. De forma alternativa, los compuestos objetivo pueden ser biomoléculas sintetizadas *in vivo* o *in vitro* de origen natural. Los compuestos (agentes) que se van a someter a prueba para detectar su capacidad para actuar como moduladores de crecimiento de tejidos se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), se pueden producir químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, que incluyen peptidomiméticos) o se pueden producir de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados por la presente descripción incluyen moléculas orgánicas que no son peptidilo, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, glúcidos, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En un aspecto específico, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 Daltons.

Los compuestos de prueba de la descripción se pueden proporcionar como entidades individuales, discretas o se

proporcionan en colecciones de mayor complejidad, tales como preparados mediante química combinatoria. 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 prueba al sistema de prueba puede ser tanto en una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de cribado.

- 5 Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar opcionalmente con otros compuestos y tienen grupos de derivatización que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitativos de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, microesferas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes de reticulación fotoactivable o cualquier combinación de los mismos.

10

En muchos programas de cribado de fármacos cuyas colecciones de compuestos y extractos naturales, son deseables los ensayos de alta capacidad para maximizar el número de compuestos estudiados en un determinado periodo de tiempo. Los ensayos que se realizan en sistemas extracelulares, tales como los que pueden derivar de proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como estudios "principales" en que se pueden generar para

15 permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba se pueden ignorar en general en el sistema *in vitro*, en su lugar, el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como se puede manifestar en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando de ActRIIB).

20

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado ejemplar de la presente descripción, el compuesto objetivo se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que habitualmente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. Se le añade a continuación la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB a una composición que contiene un ligando de ActRIIB. La detección y cuantificación de

25 complejos de ligandos de ActRIIB/ActRIIB proporcionan un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto se puede evaluar mediante la generación de curvas de respuesta a la dosis a partir de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, un ensayo de control también se puede realizar para proporcionar un valor de referencia para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade el

30 ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y la formación del complejo de ligandos de ActRIIB/ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos puede variar, y se pueden mezclar de forma simultánea. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos celulares y lisados para conseguir un sistema de ensayo extracelular adecuado.

35

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión se puede detectar mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable tales como radiomarcado (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcado con fluorescencia (por ejemplo, FITC), o polipéptido ActRIIB marcado enzimáticamente o su proteína de unión,

40 mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

45

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) en la medición, ya sea directa o indirectamente, del grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de onda ópticas (la publicación PCT WO 96/26432 y la patente estadounidense n.º 5.677.196), la resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga de superficie y sensores de fuerza de superficie, son compatibles con muchos aspectos de la descripción.

50

Además, la presente descripción contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpen o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su compañero de unión. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.283.317; Zervos y col. (1993) Cell 72:223-232; Madura y col. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel y col. (1993) Biotechniques 14:920-924 y Iwabuchi 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 (por ejemplo, pequeñas moléculas o péptidos) que

55 disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81 y las patentes estadounidenses n.º 5.525.490; 5.955.280 y 5.965.368.

60

En ciertos aspectos, los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, una

interacción de este tipo se puede identificar a nivel de proteínas usando procedimientos bioquímicos *in vitro*, que incluyen fotorreticulación, unión al ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB y col., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos se pueden examinar en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un
5 acontecimiento de unión en fase sólida o en fase líquida. De forma alternativa, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB se puede transfectar con un sistema indicador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa o la proteína fluorescente verde) en una célula y se puede cribar contra la colección preferiblemente mediante un cribado de alta capacidad o con miembros individuales de la colección. Se pueden usar ensayos de unión basados en otro mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar
10 con la diana fijada a un pocillo, esfera o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar en general mediante resonancia colorimétrica o de fluorescencia o de plasmón superficial.

5. Usos terapéuticos ejemplares

15 En ciertos aspectos, los polipéptidos de la trampa de GDF de la presente descripción se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates y, en particular, en pacientes humanos. Adicionalmente, como se muestra en esta solicitud, los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en combinación con activadores del receptor de la EPO para lograr un aumento de los glóbulos rojos en los intervalos de
20 dosificación más bajos. Esto puede ser beneficioso para reducir los efectos inespecíficos y los riesgos asociados con altas dosis de activadores del receptor de la EPO. En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar o prevenir anemia en un individuo en necesidad del mismo mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la trampa de GDF o una combinación (o terapia simultánea) de un polipéptido de la trampa de GDF y un activador del receptor de la EPO. Estos procedimientos
25 se pueden usar para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos y, en particular, seres humanos.

Los polipéptidos de la trampa de GDF se pueden usar en combinación con activadores del receptor de la EPO para reducir la dosis necesaria de estos activadores en pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de la EPO. Los efectos adversos principales de la EPO son un aumento excesivo de los niveles de hematocritos o hemoglobina y policitemia. Los niveles elevados de hematocritos pueden llevar a hipertensión (más particularmente, agravamiento
30 de la hipertensión) y a trombosis vascular. Otros efectos adversos de la EPO que se han documentado, algunos de los cuales están relacionados con la hipertensión, son cefalea, síndrome pseudogripal, obstrucción de anastomosis, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debido a trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplasia de glóbulos rojos (Singibarti, (1994) J. Clin Invest 72(supl. 6), S36-S43; Horl y col. (2000) Nephrol Dial Transplant 15(supl. 4),
35 51-56; Delanty y col. (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346(7), 522-523).

El efecto rápido en los niveles de glóbulos rojos de los polipéptidos de la captura de GDF descritos en esta solicitud indican que estos agentes actúan mediante un mecanismo diferente a la EPO. En consecuencia, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina en pacientes que no responden bien
40 a la EPO. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis de normal a aumentada (>300 UI/kg/semana) de EPO no da lugar al aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel objetivo. Se encuentran pacientes con una respuesta inadecuada a la EPO para todos los tipos de anemia, pero los números más altos de pacientes que no respondieron al tratamiento se ha observado con especial frecuencia en pacientes con cáncer y pacientes con nefropatía terminal. Una respuesta inadecuada a la
45 EPO puede ser constitutiva (es decir, observada tras el primer tratamiento con EPO) o adquirida (por ejemplo, observada tras el tratamiento repetido con EPO).

Como se usa en esta solicitud, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada con respecto a una
50 muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con respecto a la muestra de control no tratada. El término "tratar", como se usa en esta solicitud, incluye la profilaxis de la condición identificada o mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento se pueden discernir en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro profesional sanitario y el resultado pretendido de administración del agente terapéutico.

55 Como se muestra en esta solicitud, los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y los polipéptidos de la trampa de GDF de este tipo se pueden usar en las poblaciones de pacientes seleccionadas. Los ejemplos de las poblaciones de pacientes apropiado incluyen aquellos con niveles
60 indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como los pacientes que tienen anemia y aquellos que

están en riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos y hemoglobina, tales como aquellos pacientes que están a punto de someterse a una cirugía mayor u otros procedimientos que pueden dar lugar a una pérdida considerable de sangre. En un aspecto, un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos se trata con un polipéptido de la trampa de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos, a continuación, se le extrae sangre y se almacena para su posterior uso en transfusiones.

Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, descritos en esta solicitud se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen una anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel inferior a lo normal para la categoría apropiada de edad y género puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl en general se considera el límite inferior normal en la población adulta general. Las causas potenciales incluyen pérdida de sangre, déficit nutricional, reacción a la medicación, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, trasplante de médula ósea. La anemia también se puede asociar con las siguientes afecciones: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon); tumores del sistema linfático (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfomas no Hodgkin y Hodgkin); tumores del sistema hematopoyético (por ejemplo, leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (por ejemplo, pautas posológicas 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 (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, que incluye afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; hemorragia aguda o 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 (por ejemplo, algunos testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemias; uso o abuso de drogas, por ejemplo, abuso de alcohol; pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa que impide las transfusiones y pacientes de edad avanzada o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones sobre la sobrecarga circulatoria.

Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, serían apropiados para el tratamiento de anemias hipoproliferativas de la médula ósea, que normalmente se asocian con un pequeño cambio en la morfología de los glóbulos rojos (GR). Las anemias hipoproliferativas incluyen: 1) anemia de enfermedad crónica, 2) anemia de enfermedad renal y 3) anemia asociada a estados hipometabólicos. En cada uno de estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son *inapropiadamente bajos* para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen: 4) anemia ferropénica en fase precoz y 5) anemia provocada por daño en la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son *inapropiadamente altos* para el grado de anemia observado.

El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que abarca inflamación, infección, lesión de tejidos y las afecciones tales como el cáncer, y se distingue tanto por los niveles de eritropoyetina bajos como por una *respuesta inadecuada* a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^o edición.; McGraw Hill, Nueva York, pp. 628-634). Hay muchos factores que pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos se asocian con la progresión de la enfermedad en sí y la generación de citocinas inflamatorias, tales como interleucina-1, interferón-gamma y el factor de la necrosis tumoral (Bron y col., 2001, Semin Oncol 28(Supl. 8):1-6). Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido clave en la regulación del hierro, la hepcidina, lo que inhibe de este modo la exportación de hierro a partir de macrófagos y, en general, limita la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400). La pérdida de sangre a través de diversas rutas también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de la anemia debido a la progresión del cáncer varía con el tipo de cáncer, que oscila desde un 5 % en el cáncer de próstata hasta un 90 % en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer tiene consecuencias graves para los pacientes, que incluyen la fatiga y reducción de la calidad de vida, reducción de la eficacia del tratamiento y aumento de la mortalidad.

La enfermedad renal crónica se asocia con la anemia hipoproliferativa que varía en gravedad con el grado de insuficiencia renal. Una anemia de este tipo se debe principalmente a una *producción* inadecuada de eritropoyetina y a la supervivencia reducida de los glóbulos rojos. Normalmente, la enfermedad renal crónica continúa gradualmente durante un periodo de años o décadas hasta la enfermedad terminal (estadio 5), en este punto, 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 de la enfermedad renal están bien documentadas e incluyen el desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda, deterioro de la función

cognitiva, reducción de la calidad de vida y función inmunitaria alterada (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). Como se ha demostrado por los solicitantes en un modelo de ratón de la enfermedad renal crónica (véase el ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de la trampa de GDF, combinado opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, para tratar la anemia de enfermedad renal.

Muchas de las afecciones que dan lugar a una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa de leve a moderada. Entre dichas condiciones se encuentran los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, la anemia se puede producir en la enfermedad de Addison, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo o varones castrados o tratados con estrógenos. La anemia de leve a moderada también se puede producir con una ingesta dietética reducida de proteínas, una afección frecuente especialmente en los pacientes de edad avanzada. Por último, la anemia se puede desarrollar en pacientes con enfermedad hepática crónica derivada de casi cualquier causa (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17.º edición; McGraw Hill, Nueva York, pp. 628-634).

La anemia resultante de la pérdida de sangre aguda de volumen suficiente, tal como de un traumatismo o hemorragia postparto, se conoce como anemia posthemorrágica aguda. La pérdida aguda de sangre provoca inicialmente hipovolemia sin anemia puesto que no hay reducción proporcional de los glóbulos rojos, 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 lugar a hemodilución y anemia. La pérdida de sangre, si es crónica, reduce gradualmente las reservas de hierro del cuerpo y, finalmente, lleva a una deficiencia de hierro. Como se ha demostrado por los solicitantes en un modelo de ratón (véase el ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de la trampa de GDF, combinado opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, para acelerar la recuperación de la anemia de la pérdida aguda de sangre.

La anemia ferropénica es la última etapa en una progresión gradual de una deficiencia de hierro aumentada, que incluye el balance negativo de hierro y eritropoyesis ferropénica como etapas intermedias. La deficiencia de hierro puede ser el resultado de una demanda mayor de hierro, disminución en la ingesta de hierro o aumento en la pérdida de hierro, como se ejemplifica en afecciones tales como el embarazo, dieta inadecuada, absorción intestinal insuficiente, inflamación aguda o crónica y pérdida de sangre aguda o crónica. Con la anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea sigue siendo hipoproliferativa y la morfología de los glóbulos es en gran medida normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede dar lugar a algunos glóbulos rojos microcíticos hipocrómicos cada vez más prevalentes, y la transición a anemia ferropénica grave viene acompañada por hiperproliferación de la médula ósea y glóbulos rojos microcíticos hipocrómicos (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17.º edición; McGraw Hill, Nueva York, pp. 628-634). La terapia apropiada para la anemia ferropénica depende de su causa y gravedad, con preparaciones orales de hierro, formulaciones parenterales de hierro y transfusión de glóbulos rojos como principales opciones convencionales. Se podría usar un polipéptido de la trampa de GDF, combinado opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, para tratar las anemias ferropénicas solo o en combinación con estrategias terapéuticas convencionales, en particular, para tratar anemias de origen multifactorial.

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

Los polipéptidos de la trampa de GDF, combinados opcionalmente con un activador del receptor de la EPO, también serían apropiados para tratar anemias de maduración de los glóbulos rojos desordenados, que se caracterizan en parte por glóbulos rojos de tamaño insuficiente (microcíticos), de gran tamaño (macrocíticos), deformes o con un color anormal (hipocrómicos).

Los pacientes se pueden tratar con una pauta de dosificación destinada a restaurar al paciente a un nivel objetivo de hemoglobina, normalmente, entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl y, típicamente, aproximadamente 11,0 g/dl (véase también Jacobs y col. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), aunque los niveles objetivo más bajos pueden provocar menos efectos cardiovasculares secundarios. De forma alternativa, los niveles de hematocritos (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupada por las células) se pueden usar como medida para la afección de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocritos para individuos sanos oscilan de un 41 a un 51 % para hombres adultos y de un 35 a un 45 % para mujeres adultas. Los niveles objetivo de hematocritos son normalmente aproximadamente un 30-33 %. Además, los niveles de hemoglobina/hematocritos varían de persona a persona. Por tanto, de forma óptima, el nivel objetivo de hemoglobina/hematocritos se puede individualizar para cada paciente.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para la gestión de un paciente que ha sido tratado con, o es un candidato para ser tratado con, un polipéptido de la trampa de GDF mediante la medición de uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos se pueden usar para evaluar la dosificación apropiada para un paciente que es un candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF, para monitorizar los parámetros hematológicos durante el tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF, para evaluar si hay que ajustar la dosis durante el tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF y/o para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada de un polipéptido de la trampa de GDF. Si uno o más de los parámetros hematológicos se encuentran fuera del nivel normal, la dosificación con un polipéptido de la trampa de GDF se puede reducir, retrasar o concluir.

Los parámetros hematológicos que se pueden medir de acuerdo con los procedimientos proporcionados en esta solicitud incluyen, por ejemplo, los niveles de glóbulos rojos, presión arterial, reservas de hierro y otros agentes encontrados en los líquidos corporales que se correlacionan con un aumento en los niveles de glóbulos rojos, usando procedimientos reconocidos en la técnica. Los parámetros de este tipo se pueden determinar usando una muestra de sangre de un paciente. Un aumento en los niveles de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina o niveles de hematocritos puede provocar un aumento en la presión arterial.

En un aspecto, si uno o más parámetros hematológicos se encuentran fuera del intervalo normal, o en la parte alta de lo normal, en un paciente que es un candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF, entonces, el inicio de la administración del polipéptido de la trampa de GDF se puede retrasar hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable, ya sea de forma natural o por medio de una intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, entonces, el paciente se puede tratar con un agente de reducción de la tensión arterial para la presión arterial del paciente. Cualquier agente de reducción de la presión arterial apropiado para la afección del paciente individual se puede usar que incluye, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (que incluyen bloqueantes alfa y bloqueadores beta), vasodilatadores, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o bloqueantes del receptor de la angiotensina II. La presión arterial se puede tratar de forma alternativa con una pauta de dieta y ejercicio. De forma similar, si un paciente candidato tiene las reservas de hierro que son más bajas de lo normal, o en la parte baja de lo normal, 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 los pacientes que tienen niveles más altos de lo normal de glóbulos rojos y/o hemoglobina, entonces, la administración del polipéptido de la trampa de GDF se pueden retrasar hasta que los niveles hayan vuelto a un nivel normal o aceptable.

En ciertos aspectos, si uno o más parámetros hematológicos se encuentran fuera del intervalo normal, o en la parte alta de lo normal, en un paciente que es un candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF, entonces, el inicio de la administración puede no retrasarse. Sin embargo, la cantidad o frecuencia de dosificación del polipéptido de la trampa de GDF se puede establecer en una cantidad que reduzca el riesgo de un aumento inaceptable de los parámetros hematológicos que surgen después de la administración del polipéptido de la trampa de GDF. De forma alternativa, se puede desarrollar una pauta terapéutica para el paciente que combine un polipéptido de la trampa de GDF con un agente terapéutico que se dirige al nivel indeseable del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente tiene una presión arterial elevada, entonces, se puede diseñar una pauta terapéutica que implique la administración de un polipéptido de la trampa de GDF y un agente de reducción de la presión sanguínea. Para un paciente que tiene las reservas de hierro más bajas que las deseadas, se puede desarrollar una pauta terapéutica de un polipéptido de la trampa de GDF y suplementos de hierro.

En un aspecto, se puede(n) establecer el/los parámetro(s) del valor inicial para uno o más parámetros hematológicos para un paciente que es un candidato para ser tratado con un polipéptido de la trampa de GDF y se establece una pauta de dosificación apropiada para ese paciente en función del/de los valor(es) inicial(es). De forma alternativa, los parámetros iniciales establecidos en función de la historia médica de un paciente se podrían usar para informar de

una pauta de dosificación del polipéptido de la trampa de GDF apropiada para un paciente. Por ejemplo, si un paciente sano tiene una lectura de la presión arterial inicial establecida que está por encima del intervalo normal definido puede que no sea necesario llevar la presión de la sangre del paciente en el intervalo que se considera normal para la población en general antes del tratamiento con el polipéptido de la trampa de GDF. Los valores iniciales de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con un polipéptido de la trampa de GDF también se pueden usar como valores comparativos relevantes para monitorizar cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el polipéptido de la trampa de GDF.

En ciertos aspectos, uno o más parámetros hematológicos se miden en pacientes que están siendo tratados con un polipéptido de la trampa de GDF. Los parámetros hematológicos se pueden usar para monitorear al paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o conclusión de la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF o dosificación adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de un polipéptido de la trampa de GDF da lugar a un aumento en la presión arterial, nivel de glóbulos rojos o nivel de hemoglobina, o una reducción en las reservas de hierro, a continuación, la dosis del polipéptido de la trampa de GDF se puede reducir en cantidad o frecuencia para disminuir los efectos del polipéptido de la trampa de GDF en el uno o más parámetros hematológicos. Si la administración o un polipéptido de la trampa de GDF da lugar a un cambio en uno o más parámetros hematológicos que sean adversos para el paciente, a continuación, la dosificación del polipéptido de la trampa de GDF se puede concluir de forma temporal, hasta que el/los parámetro(s) hematológico(s) vuelva(n) a un nivel aceptable o de forma permanente. De forma similar, si uno o más parámetros hematológicos no se encuentran dentro de un intervalo aceptable después de reducir la dosis o frecuencia de administración del polipéptido de la trampa de GDF, entonces, la dosificación se puede concluir. Como alternativa, o además de, reducir o concluir la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF, el paciente se puede dosificar con un agente terapéutico adicional que se dirige al nivel indeseable en el/los parámetro(s) hematológico(s), tales como, por ejemplo, un agente de reducción de la presión arterial o un suplemento de hierro. Por ejemplo, si un paciente que está siendo tratado con un polipéptido de la trampa de GDF tiene la presión arterial elevada, a continuación, la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF se puede continuar en el mismo nivel y se añade un agente de reducción de la presión arterial a la pauta de tratamiento, la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF se puede reducir (por ejemplo, en cantidad y/o frecuencia) y se añade un agente de reducción de la presión arterial a la pauta de tratamiento, o la dosificación con el polipéptido de la trampa de GDF se puede concluir y el paciente se puede tratar con un agente de reducción de la presión arterial.

En ciertos aspectos, los pacientes que están siendo tratados con un polipéptido de la trampa de GDF, o pacientes candidatos para ser tratados con un polipéptido de la trampa de GDF, son pacientes que necesitan crecimiento muscular, tales como pacientes que padecen, o están en riesgo de desarrollar, un trastorno neuromuscular o trastorno musculodegenerativo. Por ejemplo, los pacientes o los pacientes candidatos pueden padecer, o estar en riesgo de desarrollar, la enfermedad de Lou Gehrig (ELA), síndrome de anorexia-caquexia por cáncer, distrofia muscular, atrofia muscular, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y atrofia muscular asociada con EPOC), síndrome de atrofia muscular, sarcopenia o caquexia. La distrofia muscular se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por debilitamiento gradual y deterioro de los músculos esqueléticos y, algunas veces, del corazón y los músculos respiratorios. Las distrofias musculares ejemplares que se pueden tratar con una pauta que incluye los polipéptidos objetivo de la trampa de GDF incluyen: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), distrofia muscular de Limb-Girdle (DMLG), distrofia muscular facioescapulohumeral (FSH o FSHD) (también conocida como de Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (DMM) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (DMOF), distrofia muscular distal (DD), distrofia muscular congénita (DMC).

6. Composiciones farmacéuticas

En ciertos aspectos, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF) de la presente descripción se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido de la trampa de GDF se puede administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objetivo se pueden formular para la administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

En ciertos aspectos, el procedimiento terapéutico de la invención incluye la administración de la composición sistémica o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable sin pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos de la trampa de GDF, que también se pueden incluir opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, se pueden administrar de forma simultánea o secuencial con los compuestos objetivo (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF) en los procedimientos de la descripción.

Típicamente, los compuestos se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más polipéptidos de la trampa de GDF en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, como por ejemplo, lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para entrega a un sitio de tejido objetivo (por ejemplo, médula ósea). En ciertos aspectos, las composiciones de la presente descripción pueden incluir una matriz capaz de entregar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF) a un sitio de tejido objetivo (por ejemplo, médula ósea), lo que proporciona una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos de la trampa de GDF. Las matrices de este tipo pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones objetivo definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatito, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Matrices adicionales están comprendidas por proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos anteriormente mencionados de material, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Puede alterarse la composición de biocerámicas, tal como en aluminato-fosfato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

En ciertos aspectos, los procedimientos de la descripción se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno con una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente se puede administrar también como bolo, electuario o pasta.

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

Las formas de dosificación líquida para administración por vía oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes que se usan comúnmente en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo,

acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

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

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

Se entiende que la pauta de dosificación será determinada por el médico especialista al considerar diversos factores que modifican la acción de los compuestos objetivo de la descripción (por ejemplo, polipéptidos de la trampa de GDF). Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, el recuento de glóbulos rojos del paciente, niveles de hemoglobina u otras evaluaciones de diagnóstico, recuento objetivo deseado de glóbulos rojos, edad del paciente, sexo y dieta, gravedad de cualquier enfermedad que puede contribuir a una disminución en el nivel de glóbulos rojos, tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosificación. El progreso se puede monitorizar mediante la evaluación periódica de los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina, así como evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

En ciertos aspectos, la presente descripción también proporciona genoterapia para la producción *in vivo* de polipéptidos de la trampa de GDF. Una terapia de este tipo lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La entrega de secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF se puede lograr usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere el uso de liposomas específicos para la entrega terapéutica de secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF.

Diversos vectores víricos que se pueden usar para la genoterapia como se enseña en esta solicitud incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o un ARN vírico tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Diversos vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de diana al unir, por ejemplo, un glúcido, un glucolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicos se pueden insertar en el genoma retroviral o unirse a una envoltura vírica para permitir la entrega específica del vector retroviral que contiene el polinucleótido de la trampa de GDF.

De forma alternativa, las células del cultivo de tejido se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican genes estructurales víricos gaga, pol y env, mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectan a continuación con el vector plasmídico que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de entrega dirigido para polinucleótidos de la trampa de GDF es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, esferas y sistemas a base de lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta descripción es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de entrega *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos se pueden encapsular dentro del interior acuoso y entregarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, y col., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los procedimientos para la transferencia eficiente de genes usando un vehículo liposómico se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino y col., Biotechniques, 6:682, 1988. La

composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente, en combinación con esteroides, especialmente, colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

10

EJEMPLIFICACIÓN

- La invención, que ahora se describe de forma general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con propósitos ilustrativos de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1. Generación de una trampa de GDF.

- Los solicitantes construyeron una trampa de GDF como sigue. Un polipéptido que tiene un dominio extracelular modificado de ActRIIB con una gran reducción en la unión a activina A con respecto a GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución leucina a aspartato en la posición 79 en el SEQ ID NO: 1) se fusionó con un dominio Fc de ratón o humano con un conector mínimo (tres aminoácidos) en el medio. 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 llevaron a cabo de manera similar (L79E). Las formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto al SEQ ID NO: 7, a continuación, también se generaron y se llevaron a cabo de forma equivalente en todos los aspectos sometidos a prueba. El aspartato en la posición 79 (con respecto al SEQ ID NO: 1, o la posición 60 con respecto al SEQ ID NO: 7) se resalta en gris a continuación. La valina en la posición 226 con respecto al SEQ ID NO: 7 también se resalta en gris a continuación.
- 30 El ActRIIB de la trampa de GDF (L79D 20-134)-hFc se muestra a continuación como purificado a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT
 APTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

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

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
 LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE
 PPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

40

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

(i) melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

45

(ii) activador tisular del plasminógeno (APT): MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

(iii) natural: MTAPWVALALLWGSCLAGS (SEQ ID NO: 10).

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

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHICYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

Este polipéptido se codifica por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO:12):

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
AGGGCTGTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCGCCACCG
GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
TCTTCTCTT CCCCCAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG TCCCATCGA 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

10

La purificación se podría lograr mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q Sepharose, cromatografía de fenilsefara, cromatografía de exclusión por tamaño 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 aclaramiento vírico. El eluido se neutraliza a continuación y se pasa sobre columna de intercambio iónico de Q Sepharose y se lava en Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM y se eluye en Tris 50 mM pH 8,0, con una concentración de NaCl entre 150 mM y 300 mM. El eluato se cambia a continuación en Tris 50 mM pH 8,0, sulfato de amonio 1,1 M y se pasa sobre una columna de fenilsefara, 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.

15

Las trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la relación de la unión a activina A con respecto a miostatina o GDF11) se describen en

25

Los documentos PCT/US2008/001506 y WO 2006/012627.

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

30

Se usó un ensayo del gen reportero A-204 para evaluar los efectos de proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF en la señalización mediante GDF11 y activina A. Línea celular: rhabdomyosarcoma humano (derivado de músculo). Vector reportero: pGL3 (CAGA) 12 (descrito en Dennler y col., 1998, EMBO 17: 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente

en genes sensibles de TGF-beta (PAI-1 gen), por lo que este vector es de uso general para los factores de señalización a través de Smad2 y 3.

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

5

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

10 Día 3: Adición de factores (diluidos en medio + BSA al 0,1 %). Se necesita que se incuben previamente los inhibidores con factores durante 1 hora antes de añadir a las células. 6 horas después, las células se enjuagan con PBS y se lisan las células.

15 Después de esto, se realiza un ensayo de luciferasa. En ausencia de cualquier inhibidor, la activina A mostró una estimulación 10 veces mayor que la expresión del gen reportero y una ED50 ~2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces mayor, ED50: ~1,5 ng/ml.

El ActRIIB (20-134) es un inhibidor potente de la actividad de activina, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. Las variantes se sometieron a prueba en este ensayo también.

20 Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 mediante truncamientos en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal

Las variantes de ActRIIB (20-134)-hFc con truncamientos en el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal se generaron y se sometieron a prueba para determinar la actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. Las actividades se muestran a continuación (como se mide en el medio acondicionado):

25

Truncamientos de ActRIIB-hFc en el extremo C-terminal:

	IC50 (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB (20-134)-hFc	45	22
ActRIIB (20-132)-hFc	87	32
ActRIIB (20-131)-hFc	120	44
ActRIIB (20-128)-hFc	130	158

30 Como se puede ver, los truncamientos de tres (que terminan con ... PPT), seis (que terminan con ... YEP) o más aminoácidos en el extremo C-terminal provocan una disminución de tres veces o mayor en la actividad de la molécula. El truncamiento de los últimos 15 aminoácidos de la porción de ActRIIB provoca una pérdida mayor de la actividad (véase la publicación internacional WO2006/012627).

35 Los truncamientos aminotermiales se hicieron en el fondo de una proteína ActRIIB (20-131)-hFc. Las actividades se muestran a continuación (como se mide en el medio acondicionado):

Truncamientos de ActRIIB-hFc en el extremo N-terminal:

	IC50 (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB (20-131)-hFc (GRG ...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105

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

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

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y de las trampas de GDF se sometió a prueba en un ensayo en células aisladas, como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Algunas variantes se sometieron a prueba en diferentes construcciones de truncamiento del extremo C-terminal. Como se analizó anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos provocó una reducción en la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de unión a activina mientras que conservaron casi la inhibición de origen natural de GDF-11.

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

Variantes de ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos del SEQ ID NO: 1)	Inhibición de la actividad de GDF11	Inhibición de la actividad de activina
R64	20-134	+++	+++
		(aprox. 10^{-8} M K_i)	(aprox. 10^{-8} M K_i)
A64	20-134	+	+
		(aprox. 10^{-6} M K_i)	(aprox. 10^{-6} M K_i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ poca actividad (aproximadamente 1×10^{-6} K_i) ++ actividad moderada (aproximadamente 1×10^{-7} K_i) +++ buena actividad (de tipo natural) (aproximadamente 1×10^{-8} K_i) ++++ mayor que la actividad de tipo natural.			

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

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

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

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

Especificidad de unión de variantes IIB a ligando.

	GDF11		
Proteína	Kon (1/ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB (A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB (L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB (L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB (R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
	GDF8		
Proteína	Kon (1/ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB (A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB (L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB (L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB (R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB (R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB (P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB (K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
	Activina A		
Proteína	Kon (1/ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB (A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB (L79D 20-134)-hFc			Baja unión
ActRIIB (L79E 20-134)-hFc			Baja unión
ActRIIB (R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB (R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11

	GDF11		
Proteína	Kon (1/ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

Estos datos confirman los datos del ensayo en células aisladas, 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 muestra una disminución notable (no cuantificable) en la unión a activina A.

Se han generado y sometido a prueba otras variantes, como se documenta en la publicación internacional WO2006/012627, véase, por ejemplo, las páginas 59-60, al usar ligandos acoplados al dispositivo y fluir el receptor sobre los ligandos acoplados. De forma notable, K74Y, K74F, K74I (y presumiblemente otras sustituciones hidrófobas en K74, tales como K74L) y D80I provocan una disminución en la relación entre la unión a activina A y la unión a GDF11, con respecto a la molécula K74 de tipo natural. A continuación, se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes:

15

Unión de variantes de ActRIIB-Fc solubles a GDF11 y activina A (Ensayo BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
Peso (64A)	KD = 1.8e-7M (+)	KD = 2.6e-7M (+)
Peso (64R)	N. a.	KD = 8.6e-8M (+++)
+15cola	KD ~2.6e-8M (+++)	KD = 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD = 4.35e-9 M	KD = 5.3e-9M +++++
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	-
F82A	++	-
* No se observó unión		

-- <1/5 peso unión
- ~1/2 peso unión
+ peso
++ < 2x unión aumentada
+++ ~5x unión aumentada
++++ ~10x unión aumentada
+++++ ~40x unión aumentada.

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

- 5 ActRIIB (20-134)-hFc (IgG1) se administró una vez a la semana durante 1 mes a macacos cangrejeros macho y hembra por inyección subcutánea. Se asignaron cuarenta y ocho macacos cangrejeros (24/sexo) a uno de cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se les administraron inyecciones subcutáneas de vehículo o ActRIIB-hFc a 3, 10, o 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron la patología clínica general (hematología, química clínica, coagulación y análisis de orina). ActRIIB-hFc
- 10 provocó estadísticamente valores medios elevados significativos de reticulocitos absolutos el día 15 en los animales tratados. El día 36, ActRIIB-hFc provocó diversos cambios hematológicos, que incluyen valores de anchura de distribución de reticulocitos y glóbulos rojos absolutos medios elevados y una concentración de hemoglobina corpuscular media baja. Todos los grupos tratados y de ambos sexos se vieron afectados. Estos efectos son compatibles con un efecto positivo de ActRIIB-hFc sobre la liberación de reticulocitos inmaduros de la médula ósea.
- 15 Este efecto se invirtió después de que se eliminara el fármaco de los animales tratados (día 56 del estudio). En consecuencia, se concluye que ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis.

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

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

Animales:

- 35 Se usaron dieciséis ratones C57BL/6 hembra con 6-8 semanas de edad en el estudio. Ocho ratones se inyectaron por vía subcutánea con el compuesto de prueba de ActRIIB-mFc en los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y ocho ratones se inyectaron por vía subcutánea con el vehículo de control, solución salina tamponada con fosfato (PBS), a un volumen de 100 µl por ratón. Todos los ratones se sacrificaron 8 días después de la primera inyección de acuerdo con
- 40 las directrices de atención veterinaria pertinentes. Se recogieron muestras de sangre periférica (SP) de animales individuales mediante punción cardíaca y se usaron para hemogramas completos y diferenciales (Hgc/fórmula leucocitaria). Se recogieron los fémures y bazos de cada ratón.

Pruebas realizadas:

- 45 Hemogramas Hgc/fórmula leucocitaria

Se recogió SP de cada ratón mediante punción cardíaca y se colocó en los tubos Microtainer apropiados. Las muestras se enviaron a CLV para el análisis en un contador Celldyn 3500.

50

Ensayos clonogénicos

Se evaluaron los progenitores clonogénicos de los linajes mieloide, eritroide y linfoide usando los sistemas de medio basado en metilcelulosa *in vitro* descritos a continuación.

Progenitores eritroides maduros:

5

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

Progenitores linfoides:

10

Se cultivaron progenitores clonogénicos de los linajes linfoides (UFC-pre-B) maduros en MethoCult® 3630, un medio basado en metilcelulosa que contiene interleucina 7 (10 ng/ml).

Progenitores mieloides y eritroides inmaduros:

15

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

20

Procedimientos:

Se procesaron los fémures y bazos de ratón mediante protocolos estándar. En resumen, se obtuvo médula ósea mediante lavado de la cavidad femoral con medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero bovino fetal al 2 % (IMDM con FBS al 2 %) usando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cc. Las células del bazo se obtuvieron mediante la trituración de los bazos a través de un filtro de 70 µm y enjuague del filtro con medio IMDM con FBS al 2 %. A continuación, se llevaron a cabo hemogramas de células nucleadas en ácido acético glacial al 3 % en suspensiones de células individuales usando una cámara de recuento Neubauer de modo que se pudieran calcular las células totales por órgano. Para eliminar la contaminación de los glóbulos rojos, a continuación, se diluyeron las células totales del bazo con 3 veces el volumen de tampón de lisis de cloruro de amonio y se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron y se volvieron a suspender en medio IMDM con FBS al 2 % y se realizó un segundo hemograma para determinar la concentración celular de las células después de la lisis.

Se prepararon reservas de células y se añadieron a cada formulación de medio basado en metilcelulosa para obtener las concentraciones óptimas de sembrado para cada tejido en cada formulación de medio. Las células de médula ósea se sembraron a 1×10^5 células por placa en MethoCult™ 3334 para evaluar progenitores eritroides maduros, 2×10^5 células por placa en MethoCult™ 3630 para evaluar progenitores linfoides y 3×10^4 células por placa en MethoCult™ 3434 para evaluar progenitores eritroides inmaduros y mieloides. Las células de bazo se sembraron a 4×10^5 células por placa en MethoCult™ 3334 para evaluar progenitores eritroides maduros, 4×10^5 células por placa en MethoCult™ 3630 para evaluar progenitores linfoides y 2×10^5 células por placa en MethoCult™ 3434 para evaluar progenitores eritroides inmaduros y mieloides. Los cultivos sembrados en placas por triplicado se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % hasta el recuento de las colonias y la evaluación se realizó por personal capacitado. Los progenitores eritroides maduros se cultivaron durante 2 días, los progenitores linfoides se cultivaron durante 7 días y los progenitores eritroides maduros y mieloides se cultivaron durante 12 días.

45

Análisis:

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

50

La frecuencia de células formadoras de colonias (CFC) en cada tejido se calculó como sigue:

Células sembradas por placa

55

Puntuación media de CFC por plato

Se calcularon las CFC totales por fémur o bazo como sigue:

Puntuación de CFC totales x hemograma de células nucleadas por fémur o bazo (después de la lisis de GR)

60

Número de células nucleadas cultivadas

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

Tabla: Parámetros hematológicos

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

10

Tabla: CFC de fémur y bazo

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

* el análisis preliminar indica p < 0,05.

El tratamiento de ratones con ActRIIB (20-134)-mFc, en el breve plazo de tiempo de este estudio, no dio lugar a un aumento significativo en los glóbulos rojos o en el contenido de hemoglobina. Sin embargo, el efecto sobre el contenido de células progenitoras fue notable. En los fémures, no hubo diferencia entre el número de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratados. En los bazos, el grupo tratado con el compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo en el número de células nucleadas antes de la lisis de los glóbulos rojos y en el número de la colonia de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduras (UFB-E) y el número total de progenitores por bazo. En consecuencia, se espera que, en una evolución temporal más larga, el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc pueda dar lugar a un contenido elevado de glóbulos rojos y hemoglobina.

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

Se asignaron ratones C57BL/6NTac macho con doce semanas de edad a uno de dos grupos de tratamiento (N = 10). Los ratones se dosificaron con vehículo o con una variante del polipéptido ActRIIB ("trampa de GDF") [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc] por inyección subcutánea (SC) a 10 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. A la conclusión del estudio, se recogió la sangre completa mediante punción cardiaca en tubos que contenían EDTA y se analizaron para la distribución de células usando un analizador de hematología HM2 (Abaxis, Inc).

Designación de 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

35

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

40

Resultados de hematología

	GR 10 ¹² /l	GB (g/dl)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10,7 ± 0,1	14,8 ± 0,6	44,8 ± 0,4	17,0 ± 0,1
Trampa de GDF	12,4 ± 0,4**	17,0 ± 0,7*	48,8 ± 1,8*	18,4 ± 0,2**
* = p < 0,05, ** = p < 0,01				

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

5

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

10

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

20

Resultados hematológicos después de tres semanas de dosificación

	GR (10 ¹² /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			

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

25

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

30

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

35

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

40

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

Selectividad del ligando de las variantes de ActRIIB-hFc:

Construcción de fusión	Activina A (Kd e-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 del ligando mostrada por la variante más larga, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc, con una pronunciada pérdida de unión a activina A y activina B y conservación casi completa de la unión a GDF11 en comparación con las contrapartes ActRIIB-hFc que carecían de la sustitución L79D. Téngase en cuenta que el truncamiento solo (sin sustitución L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos que se muestran en esta solicitud [comparar ActRIIB (L79 25-131)-hFc con ActRIIB (L79 20-134)-hFc].

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

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 en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal (restos 25-131 en el SEQ ID NO: 1) se fusionó en el extremo N-terminal con una secuencia líder de APT en lugar de la líder natural de ActRIIB y en el extremo C-terminal con un dominio Fc humano a través de un conector mínimo (tres restos de glicina) (figura 5). Una secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína de fusión se muestra en la figura 6 (SEQ ID NO: 27), y una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente la misma proteína de fusión se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 30). Esta proteína se expresó y se purificó usando la metodología descrita en el ejemplo 1.

Ejemplo 13. 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 en la proliferación de progenitores eritroides. Los ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) se trataron 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 el día 8 para la recogida de bazo, tibias, fémures y sangre. Se aislaron células del bazo y de la médula ósea, se diluyeron en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía un suero bovino fetal al 5 %, se suspendieron en medio basado en metilcelulosa especializado y se cultivaron durante 2 o 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en las etapas de unidades formadoras de colonias-eritroides (UFC-E) y de unidades formadoras de brotes-eritroides (UFB-E), respectivamente. El medio basado en metilcelulosa para la determinación de UFB-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluyó factor de células madre murinas recombinantes, interleucina-3 e interleucina-6, que no estaban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de UFC-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), mientras que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros constituyentes. Tanto para UFB-E como para UFC-E, el número de colonias se determinó en placas de cultivo duplicadas derivadas de cada muestra de tejido, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

Los cultivos derivados del bazo de ratones tratados con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc tuvieron el doble de colonias de UFC-E que los cultivos correspondientes de ratones de control ($P < 0,05$), mientras que el número de colonias de UFB-E no difirió significativamente con el tratamiento *in vivo*. El número de colonias de UFC-E o UFB-E de los cultivos de la médula ósea tampoco difirió significativamente con el tratamiento. Como se esperaba, el aumento en el número de colonias de UFC-E en cultivos derivados del bazo estuvo acompañado por cambios altamente significativos ($P < 0,001$) en el nivel de glóbulos rojos (aumento de un 11,6 %), concentración de hemoglobina (aumento de un 12 %) y nivel de hematocritos (aumento de un 11,6 %) en la eutanasia en ratones tratados con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración *in vivo* de una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto global para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

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

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

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

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

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

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en la anemia en un modelo de ratón nefrectomizado de enfermedad renal crónica. Los ratones C57BL/6 macho (11 semanas de edad) se sometieron a una operación simulada o una nefrectomía unilateral para reducir la capacidad de producción de eritropoyetina. Se permitió que los ratones se recuperaran durante una semana después de la operación y, a continuación, se trataron dos veces a la semana con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.; $n = 15$ por afección) o vehículo (TBS; $n = 15$ por afección) durante un total de 4 semanas. Las muestras de sangre se recogieron antes del inicio de la dosificación y después de 4 semanas de tratamiento. Mientras que los ratones nefrectomizados tratados con el vehículo mostraron una disminución significativa en el número de glóbulos rojos durante el periodo de tratamiento de 4 semanas, el tratamiento con ActRIIB (L79D 25-131)-hFc no solo impidió la disminución sino que también *aumentó* los niveles de glóbulos rojos un 17 % ($P < 0,001$) por encima del valor inicial (**figura 12**), a pesar de la reducción de la capacidad renal para la producción de eritropoyetina. En ratones nefrectomizados, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc también generó aumentos significativos desde el inicio en la concentración de hemoglobina y el nivel de hematocritos y, en particular, estimuló cada uno de estos parámetros eritropoyéticos en aproximadamente la misma medida en condiciones nefrectomizadas que en condiciones de operación simulada (**figura 13**). Por lo tanto, una trampa de GDF con el dominio extracelular de ActRIIB truncado puede aumentar los niveles de glóbulos rojos lo suficiente para revertir la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

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

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

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

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

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

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

Dos trampas de GDF, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, se evaluaron para determinar su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos en 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 del tratamiento previo), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron los niveles de glóbulos rojos (figura 15), hematocritos (figura 16), niveles de hemoglobina (figura 17) y niveles de reticulocitos (figura 18). Los macacos tratados con vehículo exhibieron niveles reducidos de glóbulos rojos, hematocritos y hemoglobina en todos los puntos temporales posteriores al tratamiento, un efecto esperado de las muestras de sangre repetidas. Por el contrario, el tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc o ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumentó estos parámetros en el primer punto temporal posterior al tratamiento (día 3) y los mantuvo a niveles sustancialmente elevados durante la duración del estudio (figuras 15-17). Es importante destacar que los niveles de reticulocitos en 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 18). Este resultado demuestra que el tratamiento con la trampa de GDF aumenta la producción de precursores de glóbulos rojos, lo que da lugar a niveles elevados de glóbulos rojos.

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

Ejemplo 18. Trampa de GDF derivada de ActRIIB5

Otros han informado de una forma alternativa, soluble de ActRIIB (denominada ActRIIB5), en la que el exón 4, que incluye el dominio transmembrana de ActRIIB, se ha reemplazado por una secuencia de extremo C-terminal diferente (WO2007/053775).

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

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGAHE
(SEQ ID NO: 36)
```

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

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGAHE
(SEQ ID NO: 37)
```

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

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
 KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
 TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHETGGCTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

Esta construcción se puede expresar en células CHO.

5

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

La EPO induce la formación de glóbulos rojos al aumentar la proliferación de precursores eritroides, mientras que las
 10 trampas de GDF podrían afectar potencialmente a la formación de glóbulos rojos de manera que complementen o
 mejoren los efectos de la EPO. Por lo tanto, los solicitantes investigaron el efecto del tratamiento combinado con EPO
 y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los parámetros eritropoyéticos. A ratones C57BL/6 machos (9 semanas de edad) se
 les administró una sola inyección 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
 15 tamponada con Tris). Los ratones se sometieron a eutanasia 72 h después de la dosificación para la recolección de
 sangre, bazos y fémures.

Los bazos y fémures se procesaron para obtener células precursoras de eritroides para el análisis de citometría de
 flujo. Después de la extracción, el bazo se cortó en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero
 20 bovino fetal al 5 % y se disoció mecánicamente empujando a través de un filtro de células de 70 µm con el émbolo de
 una jeringa estéril de 1 ml. Se limpiaron los fémures de cualquier músculo o tejido conectivo residual y se recortaron
 los extremos para permitir la extracción de la médula lavando el eje restante con medio de Dulbecco modificado de
 Iscove que contenía suero fetal bovino al 5 % a través de una aguja de calibre 21 conectada a una jeringa de 3 ml.
 Las suspensiones celulares se centrifugaron (2000 rpm durante 10 min) y los sedimentos celulares se volvieron a
 25 suspender en PBS que contenía suero fetal bovino al 5 %. Se incubaron células (10^6) con IgG anti-ratón para bloquear
 la unión no específica, a continuación, se incubaron con anticuerpos marcados con fluorescencia contra los
 marcadores de superficie celular de ratón CD71 (receptor de transferrina) y Ter119 (un antígeno asociado con
 glicoforina A de superficie celular), se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células muertas en las
 muestras se excluyeron del análisis mediante contratinción con yoduro de propidio. La diferenciación eritroide en el
 30 bazo o en la médula ósea se evaluó por el grado de marcaje con CD71, que disminuye a lo largo del transcurso de la
 diferenciación, y el marcaje con 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 lo
 tanto, la citometría de flujo se usó para determinar el número de proeritroblastos ($CD71^{alta}Ter119^{baja}$), eritroblastos
 basófilos ($CD71^{alta}Ter119^{alta}$), eritroblastos policromatófilos + ortocromatófilos ($CD71^{med}Ter119^{alta}$) y eritroblastos
 35 ortocromatófilos tardíos + reticulocitos ($CD71^{baja}Ter119^{alta}$), como se describe.

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

El análisis de los niveles de precursores eritroides puso de manifiesto 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 del
 tejido esplénico a las 72 h puso de manifiesto que la EPO alteró marcadamente el perfil del precursor eritropoyético
 50 en comparación con el vehículo, al aumentar el número de eritroblastos basófilos en más de un 170 % a expensas de

los precursores tardíos (eritroblastos ortocromatófilos tardíos y reticulocitos), que disminuyeron en más de un tercio (**figura 22**). Es importante destacar que el tratamiento combinado aumentó significativamente los eritroblastos basófilos en comparación con el vehículo, pero en menor medida que la EPO sola, al mismo tiempo que respaldaba la maduración de los precursores en etapa tardía (**figura 22**). Por lo tanto, el tratamiento combinado con EPO y ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumentó la eritropoyesis mediante un aumento equilibrado de la proliferación y maduración de precursores. Al contrario que con el bazo, el perfil de células precursoras en la médula ósea después del tratamiento combinado no difirió apreciablemente del de después de la EPO sola. Los solicitantes predicen a partir del perfil del precursor esplénico que el tratamiento combinado llevaría a un aumento en los niveles de reticulocitos y estaría acompañado de una elevación mantenida de los niveles de glóbulos rojos maduros, si el experimento se extendiera más allá de 72 h.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que se puede administrar una trampa de GDF con un dominio extracelular 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 no definido, una trampa de GDF puede moderar el fuerte efecto proliferativo de un activador del receptor de la EPO solo y aun así permitir que se alcancen niveles objetivo de glóbulos rojos con dosis más bajas de un activador del receptor de la EPO, lo que evita así posibles efectos adversos u otros problemas asociados con niveles más altos de activación del receptor de la EPO.

Aunque se han analizado realizaciones específicas de la materia, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la visión general de esta memoria descriptiva y las siguientes reivindicaciones. El alcance completo de la invención se debe determinar por referencia a las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para su uso para tratar o prevenir la anemia o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente, donde dicho aumento, tratamiento o prevención comprende administrar el polipéptido y un activador del receptor de la eritropoyetina en una cantidad efectiva;
5 donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1; y
10 donde el activador del receptor de la eritropoyetina es un agente estimulador de la eritropoyesis seleccionado de entre el grupo que consiste en epoetina alfa, la epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, darbepoetina alfa, metoxipolietilenglicol eritropoyetina beta y proteína de la eritropoyesis sintética.
2. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende:
15 a. una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a los aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO:1;
b. aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:1;
c. una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a los aminoácidos 25-131 del SEQ ID NO:1;
d. una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a los aminoácidos 25-131 del SEQ ID NO:1;
o
20 e. aminoácidos 25-131 del SEQ ID NO:1,
y donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO:1.
3. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el polipéptido se fusiona
25 con un dominio Fc de inmunoglobulina.
4. El polipéptido para su uso según la reivindicación 3, donde el polipéptido fusionado con un dominio Fc comprende:
30 a. una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:28;
b. una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:28; o
c. la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28.
- 35 5. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polipéptido comprende:
a. un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO:1; o
40 b. un ácido glutámico en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO:1.
6. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polipéptido se une al factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8).
- 45 7. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polipéptido se une al factor 11 de crecimiento y diferenciación (GDF11).
8. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cantidad administrada ya sea del activador del receptor de la eritropoyetina o del polipéptido por sí mismo es inefectiva para aumentar los
50 niveles de glóbulos rojos.
9. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia se asocia con un trastorno renal.
- 55 10. El polipéptido para su uso según la reivindicación 9, donde la anemia se asocia con enfermedad renal crónica.
11. El polipéptido para su uso según la reivindicación 9, donde la anemia se asocia con enfermedad renal aguda.
60

12. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia se asocia con tratamiento quimioterápico.
13. El polipéptido para su uso según la reivindicación 12, donde el tratamiento quimioterápico es tratamiento con un taxano.
14. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia es una consecuencia de pérdida de sangre.
- 10 15. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia se asocia con un síndrome mielodisplásico.
16. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia se asocia con mieloma múltiple.
- 15 17. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia se asocia con una talasemia.
18. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia es enfermedad de células falciformes.
- 20 19. El polipéptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la anemia es una hemoglobinopatía.
- 25 20. La combinación de un polipéptido y un activador del receptor de la eritropoyetina para su uso para tratar o prevenir anemia o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente, donde dicho aumento, tratamiento o prevención comprende administrar el polipéptido y el activador del receptor de la eritropoyetina en una cantidad efectiva; donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1; y donde el activador del receptor de la eritropoyetina es un agente estimulante de la eritropoyesis seleccionado de entre el grupo que consiste en epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, darbepoetina alfa, metoxi polietilenglicol epoetina beta y proteína de la eritropoyesis sintética.
- 30 21. La combinación para su uso según la reivindicación 20, donde el polipéptido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 y el activador del receptor de la eritropoyetina es como se define en la reivindicación 1.
- 35 22. La combinación para su uso según la reivindicación 21, donde la cantidad administrada ya sea del activador del receptor de la eritropoyetina o del polipéptido por sí mismo es inefectiva para aumentar los niveles de glóbulos rojos.
- 40 23. La combinación para su uso según la reivindicación 21 o la reivindicación 22, donde la anemia es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9-19.
- 45 24. Uso de un polipéptido para fabricar un medicamento para tratar o prevenir anemia o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente, donde dicho aumento, tratamiento o prevención comprende administrar el polipéptido y un activador del receptor de la eritropoyetina en una cantidad efectiva; donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1; y donde el activador del receptor de la eritropoyetina es un agente estimulante de la eritropoyesis seleccionado de entre el grupo que consiste en epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, darbepoetina alfa, metoxi polietilenglicol epoetina beta y proteína de la eritropoyesis sintética.
- 50 25. Uso de un polipéptido y un activador del receptor de la eritropoyetina para fabricar un medicamento para tratar o prevenir anemia o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente, donde dicho aumento, tratamiento o prevención comprende administrar el polipéptido y un activador del receptor de la eritropoyetina en una cantidad efectiva;
- 60

donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 del SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 del SEQ ID NO: 1; y

5 donde el activador del receptor de la eritropoyetina es un agente estimulante de la eritropoyesis seleccionado de entre el grupo que consiste en epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, darbepoetina alfa, metoxi polietilenglicol epoetina beta y proteína de la eritropoyesis sintética.

26. El uso según la reivindicación 24 o la reivindicación 25, donde el polipéptido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 y el activador del receptor de la eritropoyetina es como se define en la
10 reivindicación 1.

27. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, donde la cantidad administrada ya sea del activador del receptor de la eritropoyetina o del polipéptido por sí mismo es inefectiva para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

15 28. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde la anemia es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9-19.

ActRIIa	ILGRSETQEC	IFFNANWEKD	RTNQTGVEPC	YGD K DKRRHC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTN <u>Q</u> SGLERC	EGE <u>Q</u> DKRLHC	YASWRN <u>SS</u> GT

IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP
IELVKKGCWL	DDFNCYDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV	TPKPPT
GGPEVTYEPP	PTAPT

FIGURA 1

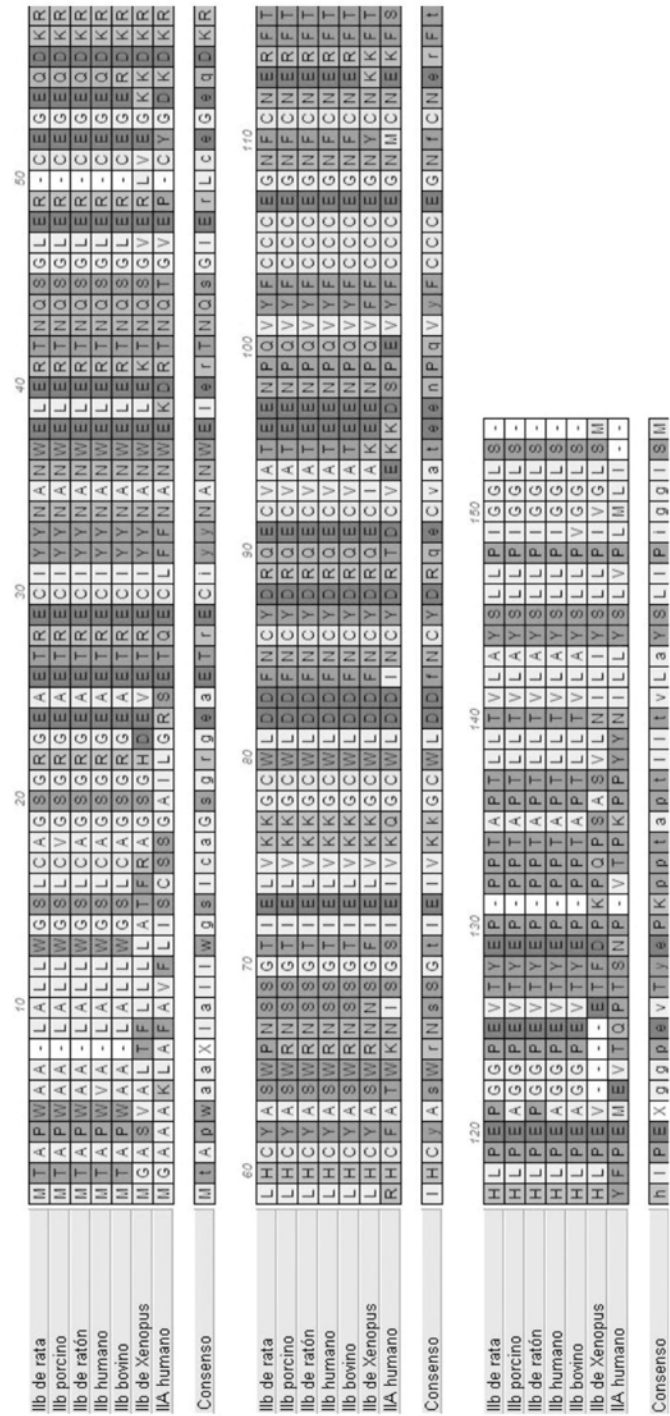


FIGURA 2

ES 2 796 121 T3

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

FIGURA 3

ES 2 796 121 T3

1	<u>ATGGATGCAA</u>	<u>TGAAGAGAGG</u>	<u>GCTCTGCTGT</u>	<u>GTGCTGCTGC</u>	<u>TGTGTGGAGC</u>
	TACCTACGTT	ACTTCTCTCC	CGAGACGACA	CACGACGACG	ACACACCTCG
51	<u>AGTCTTCGTT</u>	<u>TCGCCCCGGCG</u>	<u>CCTCTGGGCG</u>	<u>TGGGGAGGCT</u>	<u>GAGACACGGG</u>
	TCAGAAGCAA	AGCGGGCCGC	GGAGACCCGC	ACCCCTCCGA	CTCTGTGCCC
101	<u>AGTGCATCTA</u>	<u>CTACAACGCC</u>	<u>AACTGGGAGC</u>	<u>TGGAGCGCAC</u>	<u>CAACCAGAGC</u>
	TCACGTAGAT	GATGTTGCGG	TTGACCCTCG	ACCTCGCGTG	GTTGGTCTCG
151	<u>GGCCTGGAGC</u>	<u>GCTGCGAAGG</u>	<u>CGAGCAGGAC</u>	<u>AAGCGGCTGC</u>	<u>ACTGCTACGC</u>
	CCGGACCTCG	CGACGCTTCC	GCTCGTCCTG	TTCGCCGACG	TGACGATGCG
201	<u>CTCCTGGCGC</u>	<u>AACAGCTCTG</u>	<u>GCACCATCGA</u>	<u>GCTCGTGAAG</u>	<u>AAGGGCTGCT</u>
	GAGGACCGCG	TTGTCTGAGAC	CGTGGTAGCT	CGAGCACTTC	TTCCCCGACGA
251	<u>GGGATGATGA</u>	<u>CTTCAACTGC</u>	<u>TACGATAGGC</u>	<u>AGGAGTGTGT</u>	<u>GGCCACTGAG</u>
	CCCTACTACT	GAAGTTGACG	ATGCTATCCG	TCCTCACACA	CCGGTGACTC
301	<u>GAGAACCCCC</u>	<u>AGGTGTACTT</u>	<u>CTGCTGCTGT</u>	<u>GAAGGCAACT</u>	<u>TCTGCAACGA</u>
	CTCTTGGGGG	TCCACATGAA	GACGACGACA	CTTCCGTTGA	AGACGTTGCT
351	<u>GCGCTTCACT</u>	<u>CATTTGCCAG</u>	<u>AGGCTGGGGG</u>	<u>CCCGGAAGTC</u>	<u>ACGTACGAGC</u>
	CGCGAAGTGA	GTAAACGGTC	TCCGACCCCC	GGGCCTTCAG	TGCATGCTCG
401	<u>CACCCCCGAC</u>	<u>AGCCCCCACC</u>	<u>GGTGGTGGAA</u>	<u>CTCACACATG</u>	<u>CCCACCGTGC</u>
	GTGGGGGGCTG	TCGGGGGTGG	CCACCACCTT	GAGTGTGTAC	GGGTGGCAGC
451	CCAGCACCTG	AACTCCTGGG	GGGACCGTCA	GTCTTCCTCT	TCCCCCAAA
	GGTCGTGGAC	TTGAGGACCC	CCCTGGCAGT	CAGAAGGAGA	AGGGGGGTTT
501	ACCCAAGGAC	ACCCTCATGA	TCTCCCGGAC	CCCTGAGGTC	ACATGCGTGG
	TGGGTTCCTG	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	GTCCTCATG	TTCACGTTCC	AGAGGTTGTT	TCGGGAGGGT
751	GCCCCCATCG	AGAAAACCAT	CTCCAAAGCC	AAAGGGCAGC	CCCGAGAACC
	CGGGGGTAGC	TCTTTTGGTA	GAGGTTTCGG	TTTCCCGTCG	GGGCTCTTGG

FIGURA 4

ES 2 796 121 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
	CTCACCTCT	CGTTACCCGT	CGGCCTCTTG	TTGATGTTCT	GGTGCGGAGG
951	CGTGCTGGAC	TCCGACGGCT	CCTTCTTCCT	CTATAGCAAG	CTCACCGTGG
	GCACGACCTG	AGGCTGCCGA	GGAAGAAGGA	GATATCGTTC	GAGTGGCACC
1001	ACAAGAGCAG	GTGGCAGCAG	GGGAACGTCT	TTCATGCTC	CGTGATGCAT
	TGTTCTCGTC	CACCGTCGTC	CCCTTGCAGA	AGAGTACGAG	GCACTACGTA
1051	GAGGCTCTGC	ACAACCACTA	CACGCAGAAG	AGCCTCTCCC	TGTCCCCGGG
	CTCCGAGACG	TGTTGGTGAT	GTGCGTCTTC	TCGGAGAGGG	ACAGGGGCCC
1101	TAAATGA (SEQ ID NO:25)				
	ATTTACT (SEQ ID NO:33)				

FIGURA 4 CONT

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

FIGURA 5

1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC
	TACCTACGTT	ACTTCTCTCC	CGAGACGACA	CACGACGACG	ACACACCTCG
				E T R E C I Y Y	
51	AGTCTTCGTT	TCGCCC	GGCG	CCGCTGAGAC	ACGGGAGTGC
	TCAGAAGCAA	AGCGGGCCGC	GGCGACTCTG	TGCCCTCACG	TAGATGATGT
				N A N W E L E R T N Q S G L E R C	
101	ACGCCAACTG	GGAGCTGGAG	CGCACCAACC	AGAGCGGCCT	GGAGCGCTGC
	TGCGGTTGAC	CCTCGACCTC	GCGTGGTTGG	TCTCGCCGGA	CCTCGCGACG
				E G E Q D K R L H C Y A S W R N S	
151	GAAGGCGAGC	AGGACAAGCG	GCTGCACTGC	TACGCCTCCT	GGCGCAACAG
	CTTCCGCTCG	TCCTGTTTCG	CGACGTGACG	ATGCGGAGGA	CCGCGTTGTC
				S G T I E L V K K G C W D D D F	
201	CTCTGGCACC	ATCGAGCTCG	TGAAGAAGGG	CTGCTGGGAC	GATGACTTCA
	GAGACCGTGG	TAGCTCGAGC	ACTTCTTCCC	GACGACCCTG	CTACTGAAGT
				N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V	
251	ACTGCTACGA	TAGGCAGGAG	TGTGTGGCCA	CTGAGGAGAA	CCCCCAGGTG
	TGACGATGCT	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	GGGGGCCCCG	AAGTCACGTA	CGAGCCACCC	CCGACAGGTG
	CGGTCTCCGA	CCCCCGGGCC	TTCAGTGCAT	GCTCGGTGGG	GGCTGTCCAC
401	GTGGAACTCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	CCTGGGGGGA
	CACCTTGAGT	GTGTACGGGT	GGCACGGGTC	GTGGACTTGA	GGACCCCCCT
451	CCGTCAGTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAACCC	AAGGACACCC	TCATGATCTC
	GGCAGTCAGA	AGGAGAAGGG	GGGTTTTTGGG	TTCTGTGGG	AGTACTAGAG
501	CCGGACCCCT	GAGGTCACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC
	GGCCTGGGGA	CTCCAGTGTA	CGCACCAcca	CCTGCACTCG	GTGCTTCTGG
551	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC
	GACTCCAGTT	CAAGTTGACC	ATGCACCTGC	CGCACCTCCA	CGTATTACGG

FIGURA 6

ES 2 796 121 T3

601	AAGACAAAGC TTCTGTTTCG	CGCGGGAGGA GCGCCCTCCT	GCAGTACAAC CGTCATGTTG	AGCACGTACC TCGTGCATGG	GTGTGGTCAG CACACCAGTC
651	CGTCCTCACC GCAGGAGTGG	GTCCTGCACC CAGGACGTGG	AGGACTGGCT TCCTGACCGA	GAATGGCAAG CTTACCGTTC	GAGTACAAGT CTCATGTTCA
701	GCAAGGTCTC CGTTCCAGAG	CAACAAAGCC GTTGTTTTCG	CTCCCAGCCC GAGGGTCGGG	CCATCGAGAA GGTAGCTCTT	AACCATCTCC TTGGTAGAGG
751	AAAGCCAAAG TTTCGGTTTC	GGCAGCCCCG CCGTCGGGGC	AGAACCACAG TCTTGGTGTC	GTGTACACCC CACATGTGGG	TGCCCCCATC ACGGGGGTAG
801	CCGGGAGGAG GGCCCTCCTC	ATGACCAAGA TACTGGTTCT	ACCAGGTCAG TGGTCCAGTC	CCTGACCTGC GGACTGGACG	CTGGTCAAAG GACCAGTTTC
851	GCTTCTATCC CGAAGATAGG	CAGCGACATC GTCGCTGTAG	GCCGTGGAGT CGGCACCTCA	GGGAGAGCAA CCCTCTCGTT	TGGGCAGCCG ACCCGTCGGC
901	GAGAACAACT CTCTTGTTGA	ACAAGACCAC TGTTCTGGTG	GCCTCCCGTG CGGAGGGCAC	CTGGACTCCG GACCTGAGGC	ACGGCTCCTT TGCCGAGGAA
951	CTTCCTCTAT GAAGGAGATA	AGCAAGCTCA TCGTTTCGAGT	CCGTGGACAA GGCACCTGTT	GAGCAGGTGG CTCGTCCACC	CAGCAGGGGA GTCGTCCCCT
1001	ACGTCTTCTC TGCAGAAGAG	ATGCTCCGTG TACGAGGCAC	ATGCATGAGG TACGTACTCC	CTCTGCACAA GAGACGTGTT	CCACTACACG GGTGATGTGC
1051	CAGAAGAGCC GTCTTCTCGG	TCTCCCTGTC AGAGGGACAG	CCCGGGTAAA GGGCCCATT	TGA (SEQ ID NO: 27) ACT (SEQ ID NO: 34)	

FIGURA 6 CONT

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 28)

FIGURA 7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 29)

FIGURA 8

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                               E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT 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 GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
   TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151  GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
   CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

S G T I E L V K K G C W D D D F
201  CTCGGGGACG ATTGAACTTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
   GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCCTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

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

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

P E A G G P E V T Y E P P P T
351  CCCCGAAGCC GGCGGGGCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCCACCGGTG
   GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401  GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451  CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501  CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551  CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601  AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651  CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

```

FIGURA 9

ES 2 796 121 T3

701	GCAAGGTCTC CGTTCCAGAG	CAACAAAGCC GTTGTTTCGG	CTCCCAGCCC GAGGGTCGGG	CCATCGAGAA GGTAGCTCTT	AACCATCTCC TTGGTAGAGG
751	AAAGCCAAAG TTTCGGTTTC	GGCAGCCCCG CCGTCGGGGC	AGAACCACAG TCTTGGTGTC	GTGTACACCC CACATGTGGG	TGCCCCCATC ACGGGGGTAG
801	CCGGGAGGAG GGCCCTCCTC	ATGACCAAGA TACTGGTTCT	ACCAGGTCAG TGGTCCAGTC	CCTGACCTGC GGACTGGACG	CTGGTCAAAG GACCAGTTTC
851	GCTTCTATCC CGAAGATAGG	CAGCGACATC GTCGCTGTAG	GCCGTGGAGT CGGCACCTCA	GGGAGAGCAA CCCTCTCGTT	TGGGCAGCCG ACCCGTCGGC
901	GAGAACAACT CTCTTGTTGA	ACAAGACCAC TGTTCTGGTG	GCCTCCCGTG CGGAGGGCAC	CTGGACTCCG GACCTGAGGC	ACGGCTCCTT TGCCGAGGAA
951	CTTCCTCTAT GAAGGAGATA	AGCAAGCTCA TCGTTTCGAGT	CCGTGGACAA GGCACCTGTT	GAGCAGGTGG CTCGTCCACC	CAGCAGGGGA GTCGTCCCCT
1001	ACGTCTTCTC TGCAGAAGAG	ATGCTCCGTG TACGAGGCAC	ATGCATGAGG TACGTACTCC	CTCTGCACAA GAGACGTGTT	CCACTACACG GGTGATGTGC
1051	CAGAAGAGCC GTCTTCTCGG	TCTCCCTGTC AGAGGGACAG	CCCGGGTAAA GGGCCCATT	TGA (SEQ ID NO: 30) ACT (SEQ ID NO: 35)	

FIGURA 9 CONT

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC
 AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT
 GGAGGAAGTC CTCGGGACG ATTGAAGTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
 GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCGAAGCC GGCGGGCCCG
 AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACC (SEQ ID NO: 31)

FIGURA 10

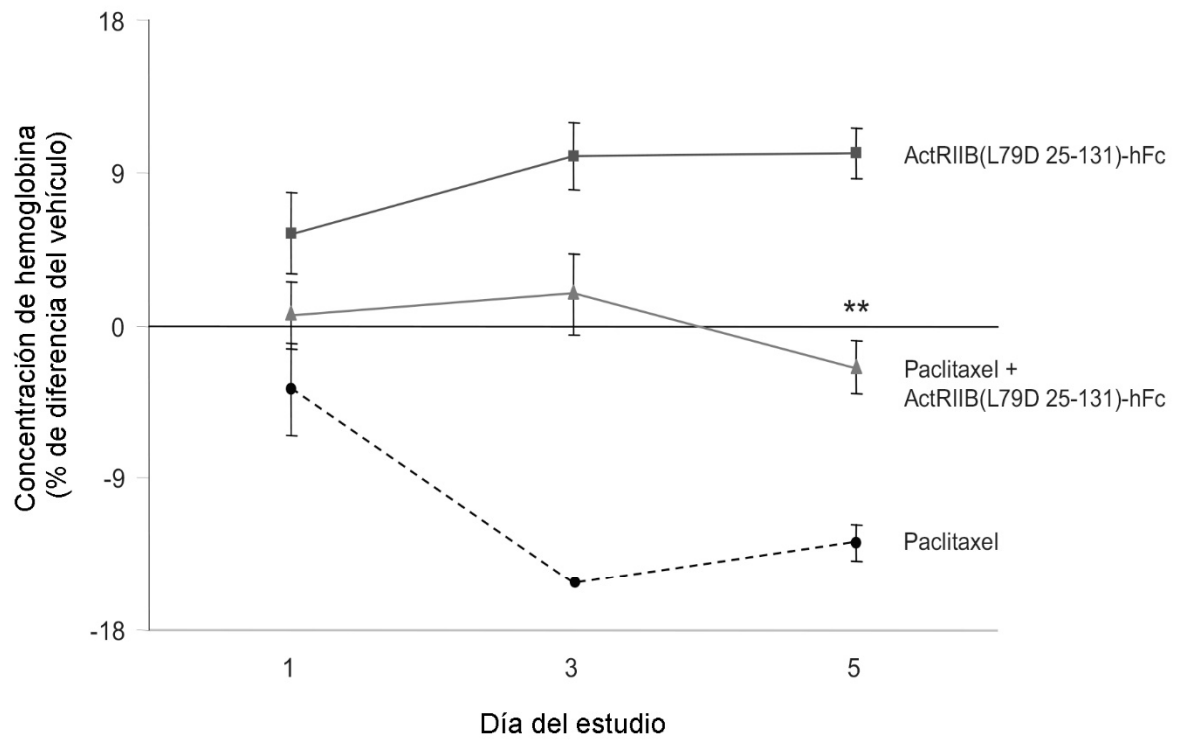


FIGURA 11

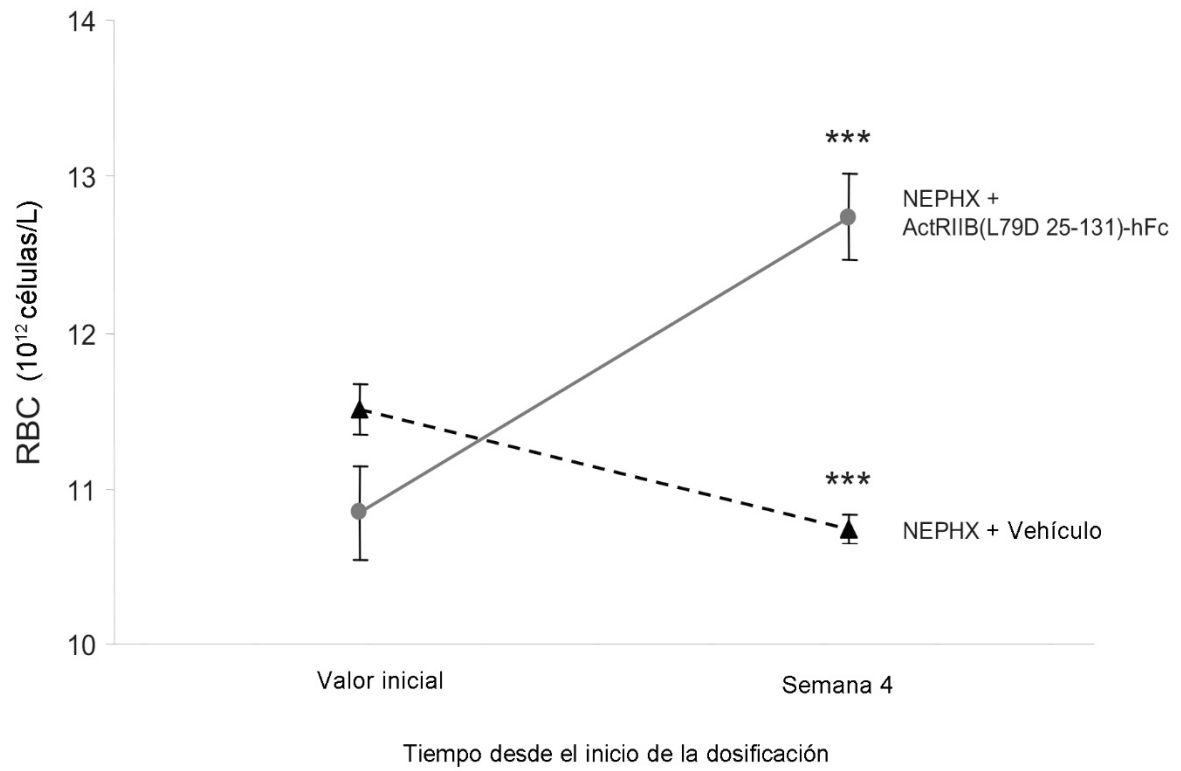


FIGURA 12

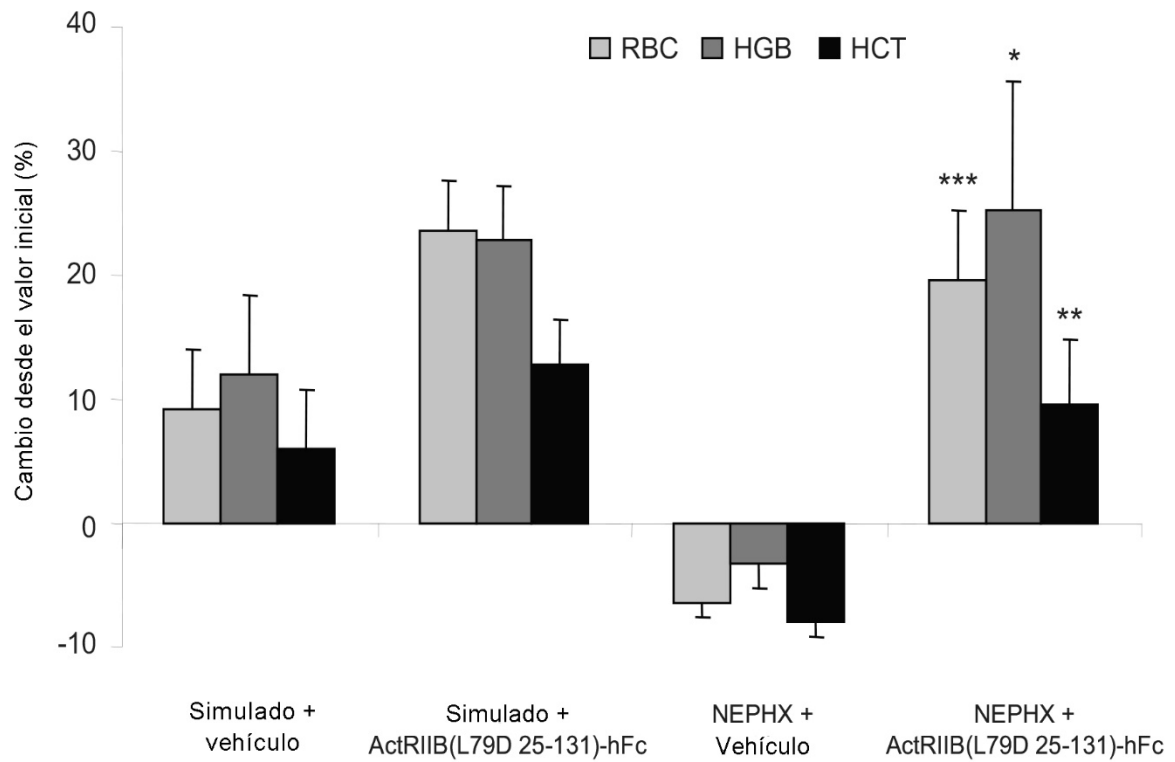


FIGURA 13

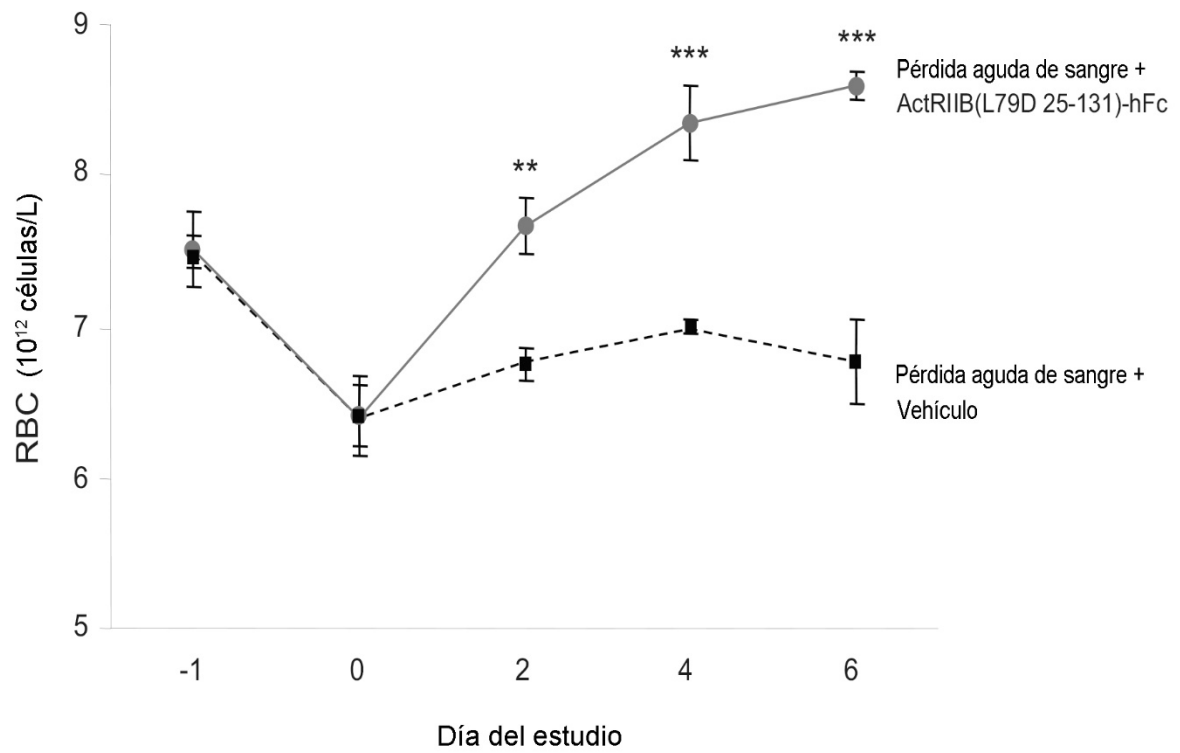


FIGURA 14

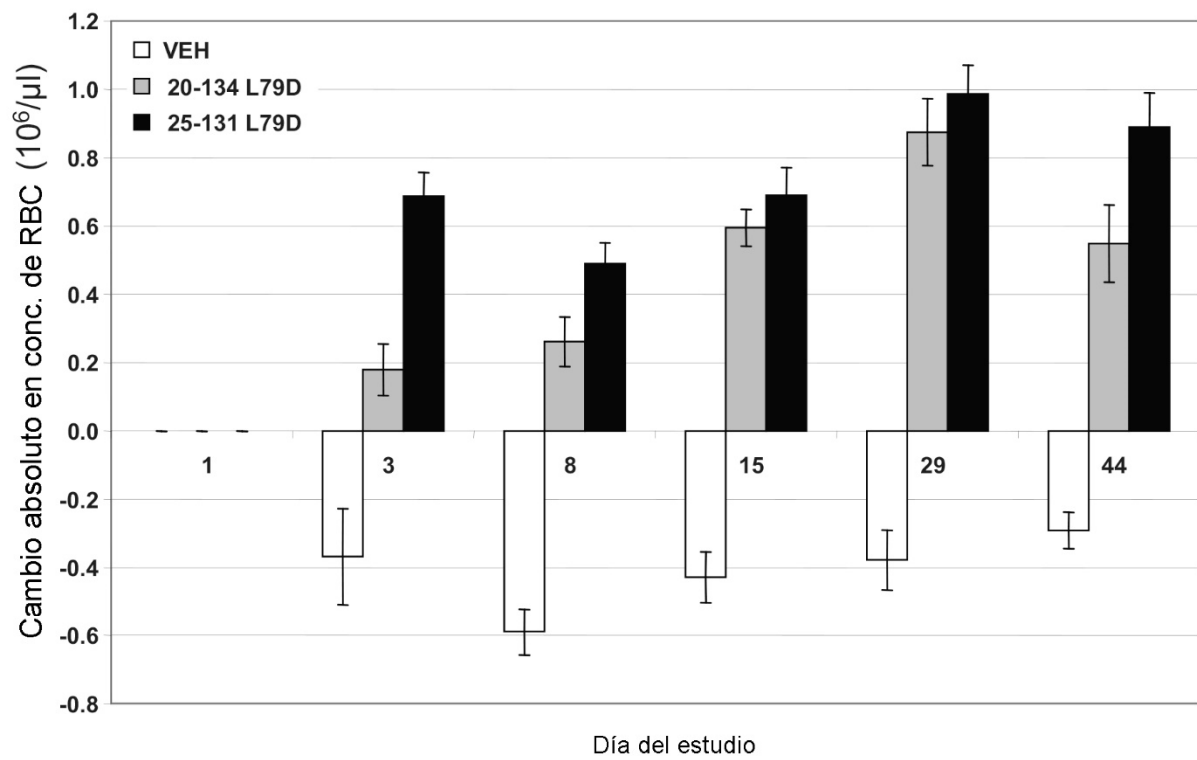


FIGURA 15

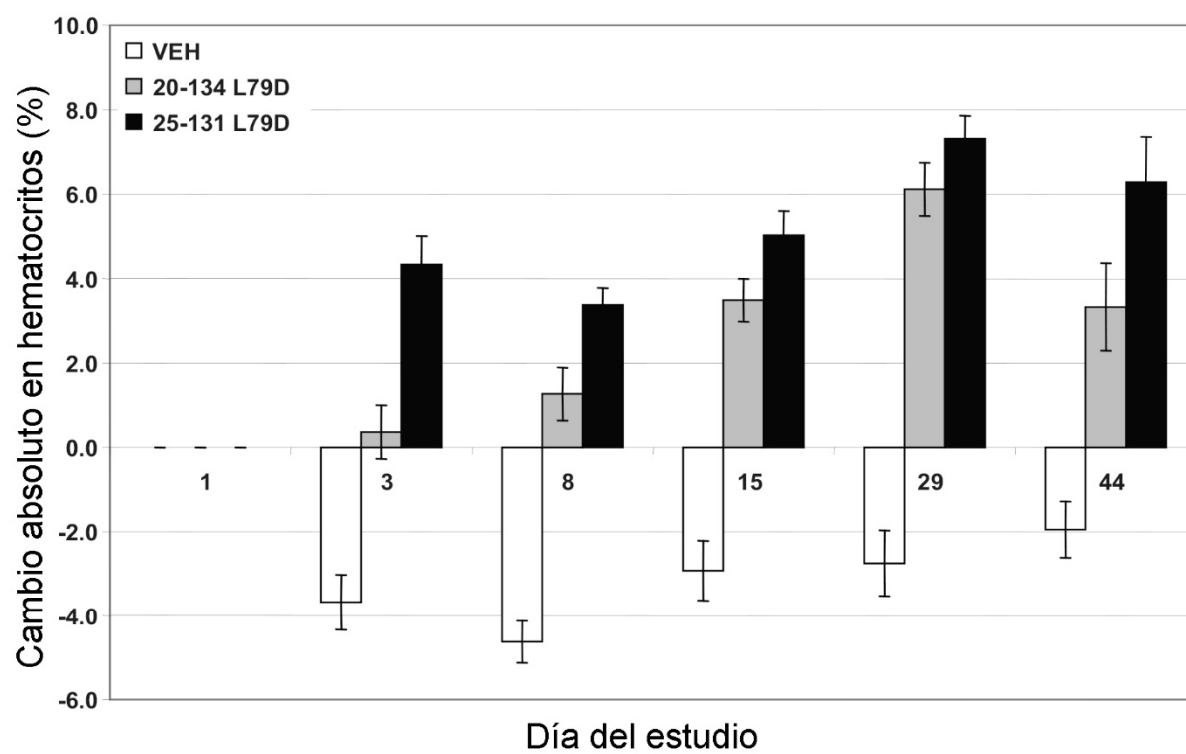


FIGURA 16

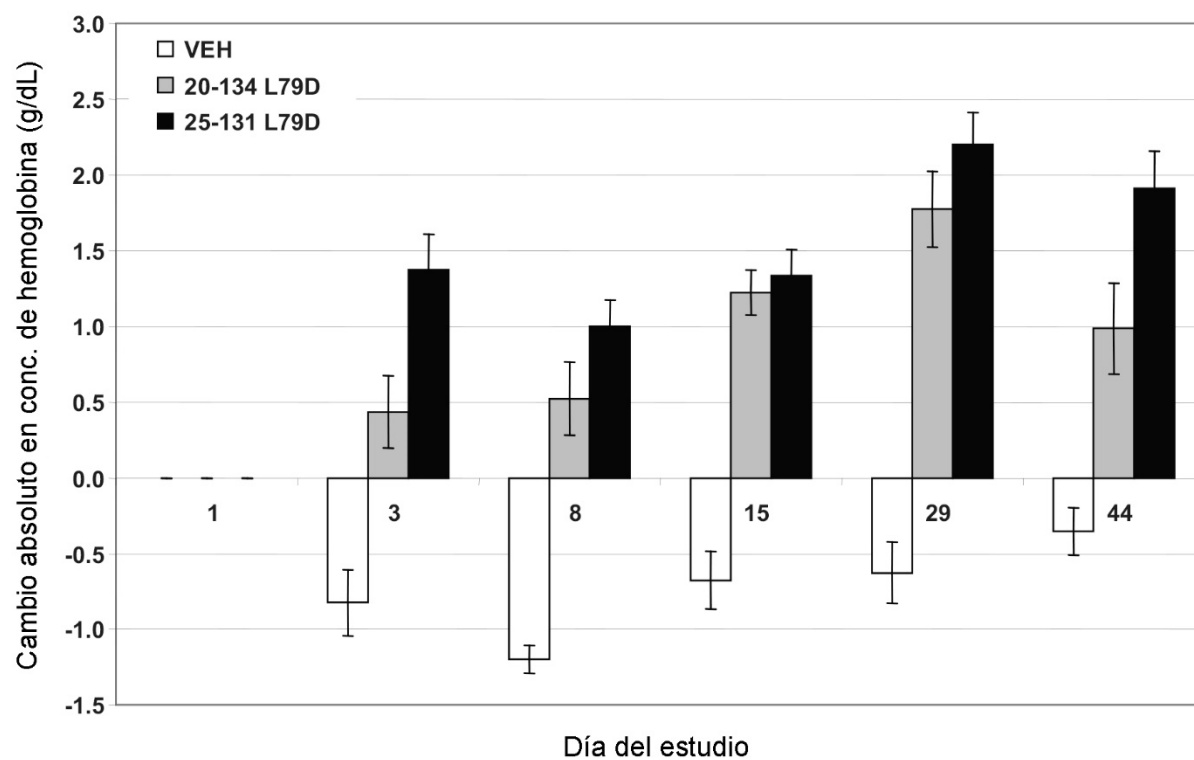


FIGURA 17

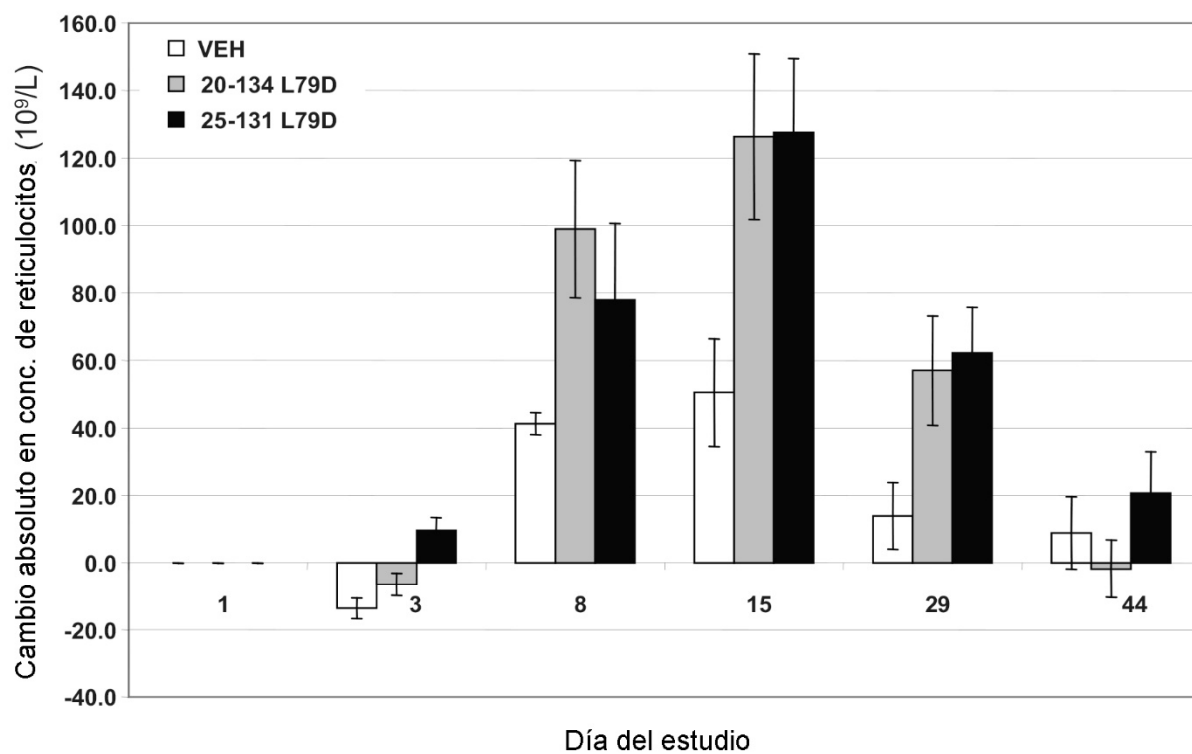


FIGURA 18

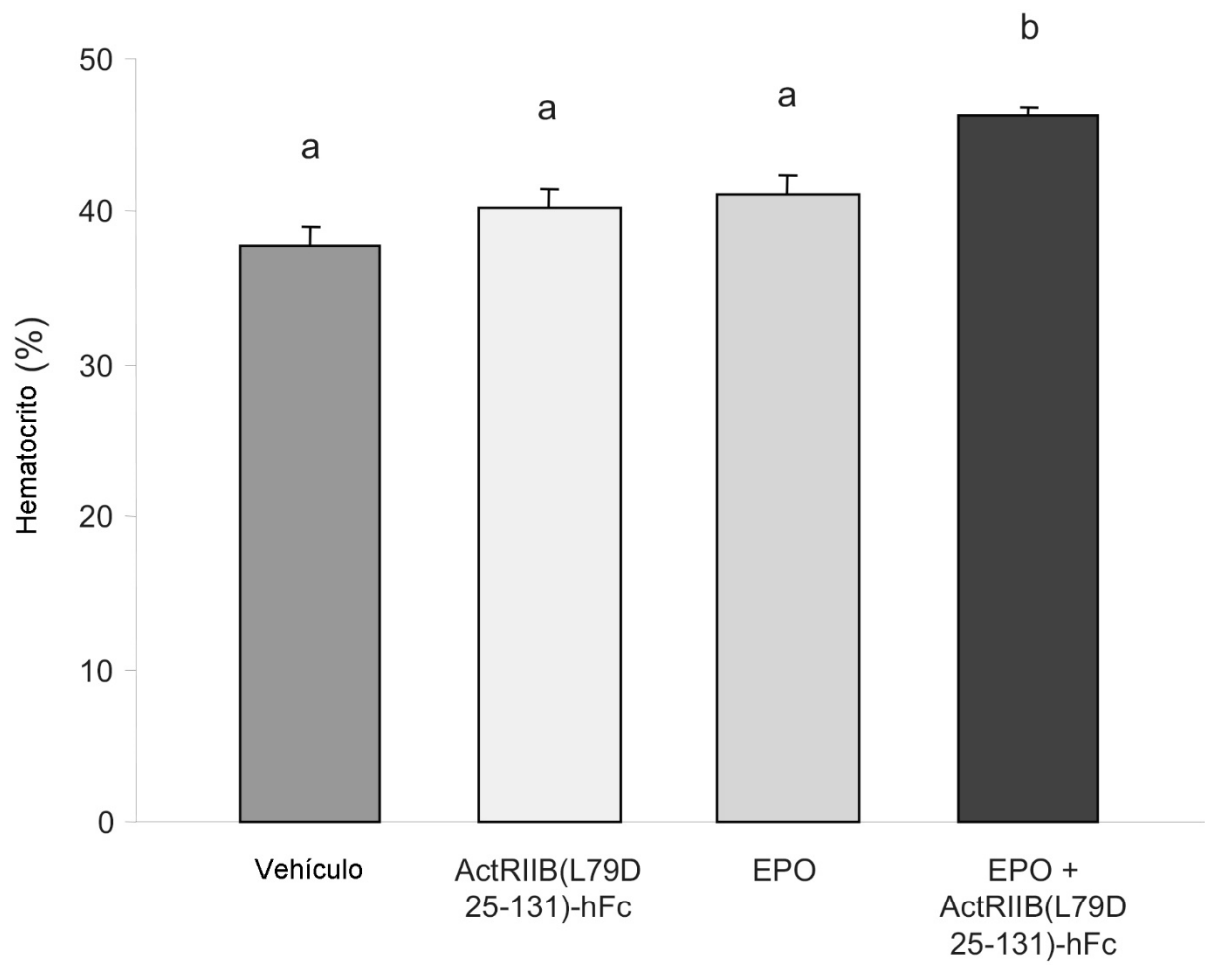


FIGURA 19

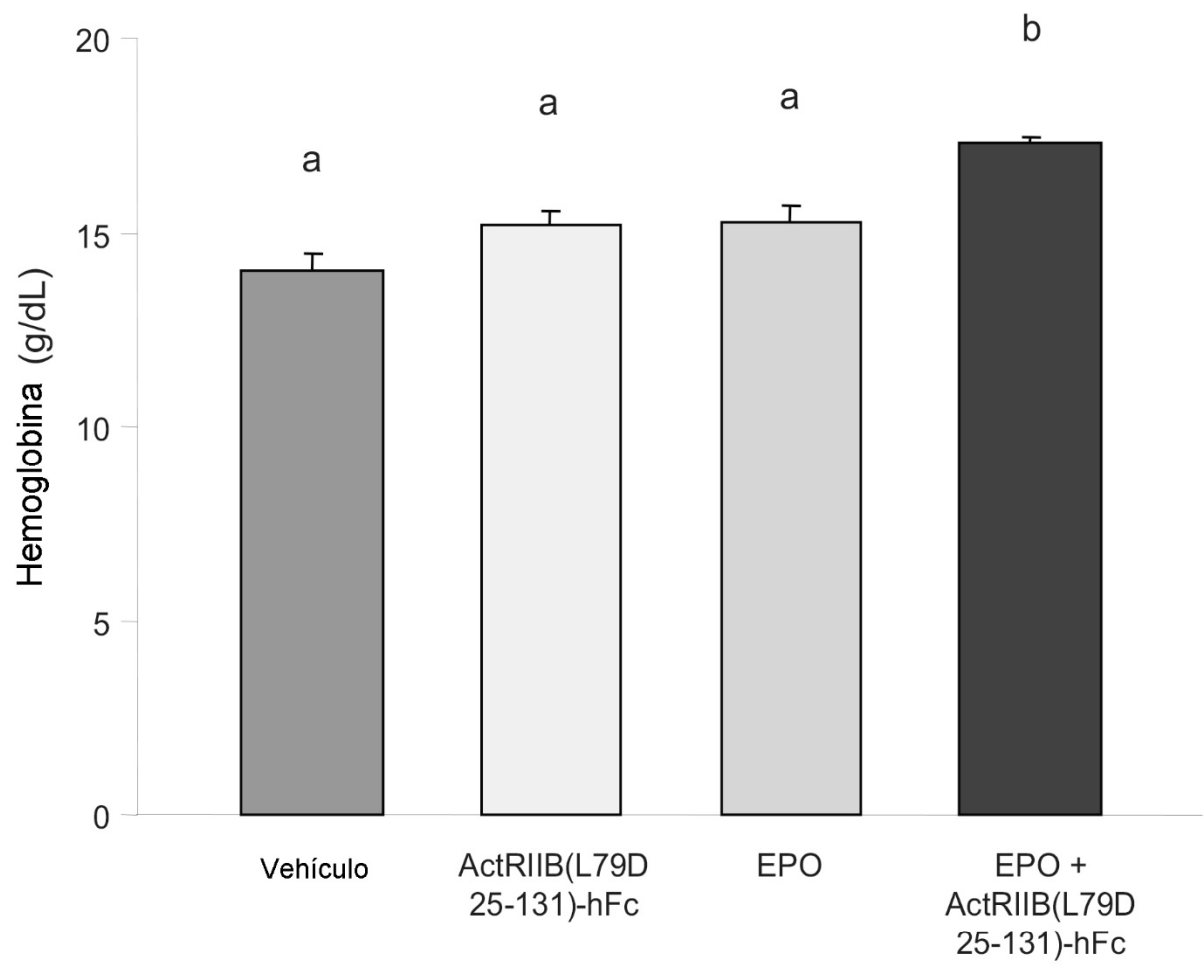


FIGURE 20

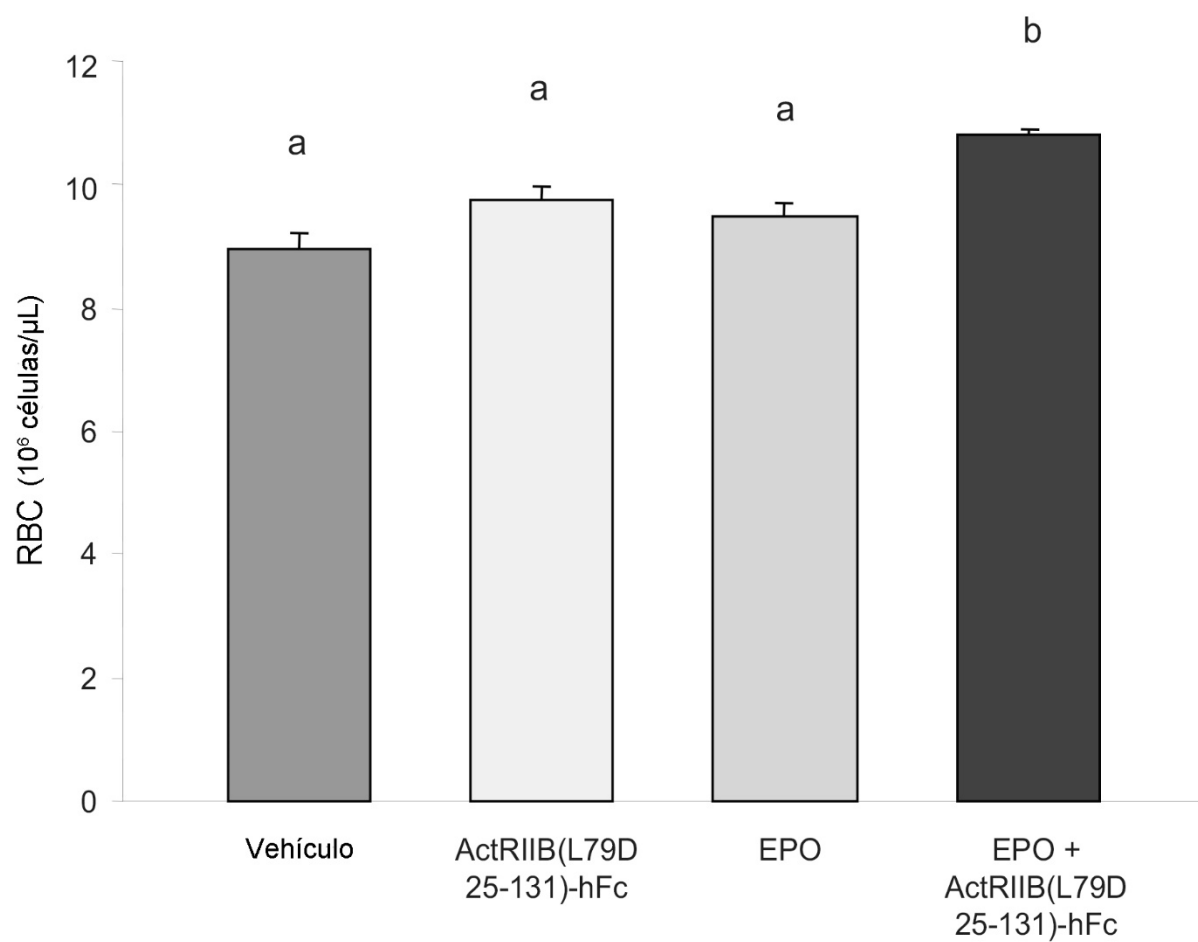


FIGURA 21

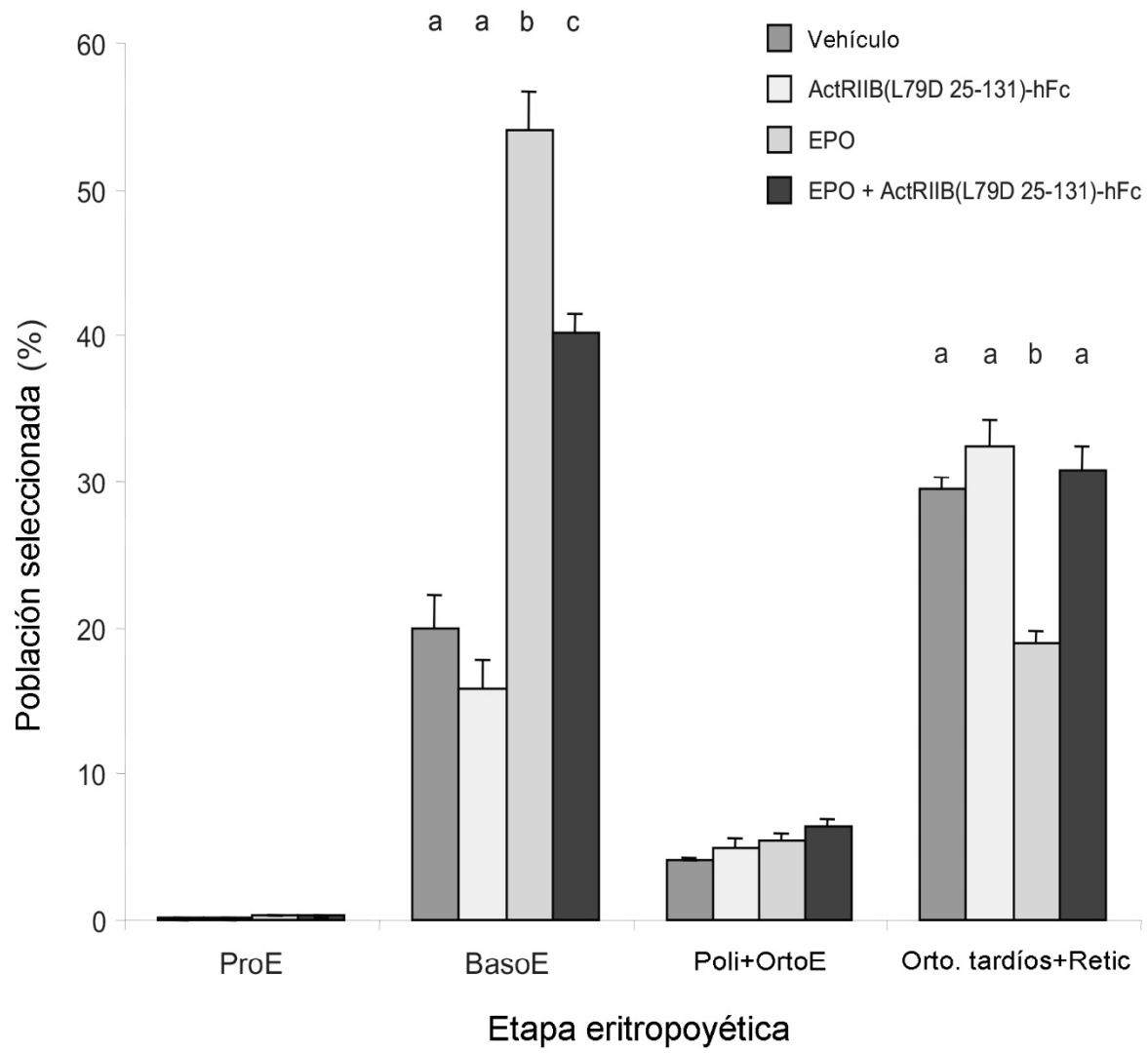


FIGURA 22