

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 738**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2018** **PCT/US2018/037213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018** **WO18231905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2018** **E 18816685 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3638243**

54 Título: **Métodos para para tratar la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa y la anemia**

30 Prioridad:

14.06.2017 US 201762519725 P

01.06.2018 US 201862679210 P

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

04.12.2024

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)

Route 206 & Province Line Road

Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

LAADEM, ABDERRAHMANE y

GALE, ROBERT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 991 738 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

Métodos para para tratar la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa y la anemia

5 **1. CAMPO**

La patente se refiere en general a métodos para tratar la anemia en un sujeto que tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa, que comprende administrar al sujeto un inhibidor de la señalización de ActRIIB.

10 **2. ANTECEDENTES**

La anemia es una disminución en el número de glóbulos rojos o cantidad inferior a la normal de hemoglobina en la sangre. La anemia también puede ser causada por una disminución en la capacidad de unión al oxígeno de la hemoglobina. La anemia es el trastorno de la sangre más común. La anemia puede ser causada por eritropoyesis ineficaz. La eritropoyesis ineficaz está presente si la eritropoyesis activa tiene lugar, pero los glóbulos rojos maduros dejan de desarrollarse en la tasa adecuada. Las células progenitoras experimentan apoptosis antes de que se alcance el estadio de glóbulos rojos maduros.

La mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa (MPN) es un término general que se usa para describir una neoplasia mieloide clonal que puede desarrollarse directamente (mielofibrosis primaria (también conocida como metaplasia mieloide agnogénica, mielofibrosis idiopática crónica, mioesclerosis con metaplasia mieloide, y mielofibrosis idiopática)) o evolucionar a partir de otras neoplasias mieloides (policitemia vera y trombocitemia esencial), y se caracteriza por disfunción y fibrosis de la médula ósea, hematopoyesis extramedular, y un estado inflamatorio aumentado. La mielofibrosis asociada a MPN produce una formación excesiva de tejido fibroso en la médula ósea, lo que puede provocar anemia grave, fatiga, debilidad, y agrandamiento del bazo y del hígado. Los tratamientos actuales para la mielofibrosis asociada a MPN incluyen hidroxiurea, esplenectomía, y trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, el tratamiento con hidroxiurea puede empeorar la anemia, y existe preocupación por su potencial mutagénico con el uso a largo plazo, la esplenectomía tiene una duración de respuesta media corta, puede acortar la supervivencia posterior a la esplenectomía y tiene una alta morbilidad posoperatoria, y el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas puede conducir a una transformación leucémica (Sochacki et al., 2016, Therapeutic approaches in myelofibrosis and myelodysplastic/myeloproliferative overlap syndromes, Onco Targets Ther, 2016(9):2273-286). Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de terapias para el tratamiento de la mielofibrosis asociada a MPN.

Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como los receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF-beta, que incluyen BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 es el receptor de tipo I primario para activinas, particularmente para activina A, y ALK-7 también puede servir como receptor para activinas, particularmente para activina B. Se han descrito inhibidores de la señalización de ActRIIB para tratar la eritropoyesis ineficaz y los síndromes mielodisplásicos (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente internacional núms. WO 2013/059347, WO 2011/020045 y WO 2016/090077).

Keohane C et al.: "Ruxolitinib for myelofibrosis", Clinical Investigation, Future Science, Reino Unido, vol. 2, núm. 10, 30 septiembre 2012 (30-09-2012), páginas 1023-1031, se refiere al uso de ruxolitinib en el tratamiento de la mielofibrosis. La anemia y la trombocitopenia se identifican como efectos secundarios del tratamiento.

A Agarwal et al.: "Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-beta", Stem cell investigation, 1 de enero de 2016 (01-01-2016), páginas 5-5, indican que la inhibición de la ruta de TGF-beta junto con otras terapias podría resultar útil en la reversión de la fibrosis de la médula ósea en la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa.

R. N. V. S. Suragani et al.: "Modified activin receptor IIB ligand trap mitigates ineffective erythropoiesis and disease complications in murine beta-thalassemia", BLOOD, vol. 123, núm. 25, 2 mayo 2014 (02-05-2014), páginas 3864-3872, describen el uso de la trampa de ligando del receptor de activina tipo IIB modificado (ActRIIB) (RAP-536) en un modelo murino de beta-talasemia. El tratamiento alivió la anemia al promover la diferenciación de los precursores eritroides en etapa tardía y reducir la hemólisis.

60 **3. SUMARIO**

Se proporciona aquí un inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso en un método para tratar la anemia en un sujeto que tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa, en el que el sujeto se ha tratado previamente con ruxolitinib, en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de

fusión que comprende: (a) un fragmento del dominio extracelular de ActRIIB, en el que el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (b) un enlazador; y (c) un Fc de una IgG. En las reivindicaciones adjuntas se proporcionan aspectos y realizaciones adicionales de la invención.

- 5 La referencia a un inhibidor de la señalización de ActRIIB en relación con la presente invención debe entenderse como una referencia al inhibidor de la señalización de ActRIIB como se definió anteriormente.

No se reivindican métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal. Si se menciona un método de tratamiento en el contexto de la presente invención, debe entenderse como un inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso en tal método.

En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es de 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 1 mg/kg. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 1 mg/kg, y el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIB que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y el dominio Fc de IgG1 humano. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular mencionado anteriormente de ActRIIB y el dominio Fc de IgG1 humano. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:4; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:4; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) 90% idéntica a SEQ ID NO:7; (f) 95% idéntica a SEQ ID NO:7; (g) 98% idéntica a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) 90% idéntica a SEQ ID NO:8; (j) 95% idéntica a SEQ ID NO:8; (k) 98% idéntica a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (n) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (o) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (p) SEQ ID NO:11. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (d) SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

El tratamiento según la invención reduce o palia uno o más síntomas de dicha mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa en dicho sujeto. En realizaciones específicas, el síntoma es uno o más de fatiga, sudores nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad temprana, o dolor óseo. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por

policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, una cantidad farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 1 mg/kg. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 1 mg/kg, y el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIB que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y el dominio Fc de IgG1 humano. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular mencionado anteriormente de ActRIIB y el dominio Fc de IgG1 humano. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:4; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:4; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) 90% idéntica a SEQ ID NO:7; (f) 95% idéntica a SEQ ID NO:7; (g) 98% idéntica a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) 90% idéntica a SEQ ID NO:8; (j) 95% idéntica a SEQ ID NO:8; (k) 98% idéntica a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (n) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (o) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (p) SEQ ID NO:11. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (d) SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de

glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la dosis es 1 mg/kg. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la dosis es 1 mg/kg. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

4. TERMINOLOGÍA Y ABREVIATURAS

Como se usa en el presente documento, "ActRII" se refiere a receptor de tipo II de activina. Como se usa en el presente documento, "ActRIIA" se refiere a receptor de tipo IIA de activina. Véase, por ejemplo, Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982. El número de acceso NM_001278579.1 de GenBank™ proporciona una secuencia del ácido nucleico de ActRIIA humano a modo de ejemplo. El número de acceso NP_001265508.1 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de ActRIIA humano a modo de ejemplo. Como se usa en el presente documento, "ActRIIB" se refiere a receptor de tipo IIB de activina. Véase, por ejemplo, Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108. El número de acceso de GenBank™ NM 001106.3 proporciona una secuencia de ácido nucleico de ActRIIB humana ejemplar. El número de acceso NP_001097.2 de GenBank™ proporciona una secuencia de aminoácidos de ActRIIB humano a modo de ejemplo.

Como se usan aquí, "Hb" y "Hgb" se refieren a hemoglobina.

Como se usa aquí, "mg/kg", en el contexto de una dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB, se refiere a miligramos del inhibidor de la señalización de ActRIIB por kilogramo del peso del sujeto al que se le va a administrar el inhibidor de la señalización de ActRIIB.

Como se usa aquí, "MF" se refiere a mielofibrosis.

Como se usa aquí, "PMF" se refiere a mielofibrosis primaria.

Como se usa aquí, "MF post-PV" se refiere a la mielofibrosis posterior a policitemia vera.

Como se usa aquí, "MF post-ET" se refiere a mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial.

Como se usa aquí, "MPN" se refiere a neoplasia mieloproliferativa.

Como se usa en el presente documento, "RBC" se refiere a glóbulos rojos.

Como se usa en el presente documento, "RBC-T1" se refiere a independiente de la transfusión de glóbulos rojos.

4.1 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1: Mecanismo de acción de luspatercept.

FIG. 2: Diseño del estudio.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

5.1 VISIÓN GENERAL

Se proporciona aquí un inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso en un método para tratar la anemia en un sujeto que tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa, en el que el sujeto se ha tratado previamente con ruxolitinib, en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión que comprende: (a) un fragmento del dominio extracelular de ActRIIB, en el que el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (b) un enlazador; y (c) un Fc de una IgG. En las reivindicaciones adjuntas se proporcionan aspectos y realizaciones adicionales de la invención.

En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos

rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es de 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIB que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio Fc de IgG1 humano. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:4; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:4; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) 90% idéntica a SEQ ID NO:7; (f) 95% idéntica a SEQ ID NO:7; (g) 98% idéntica a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) 90% idéntica a SEQ ID NO:8; (j) 95% idéntica a SEQ ID NO:8; (k) 98% idéntica a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (n) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (o) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (p) SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (d) SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

El tratamiento según la invención reduce o alivia uno o más síntomas de dicha mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa en dicho sujeto. En realizaciones específicas, el síntoma es uno o más de fatiga, sudores nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad temprana, o dolor óseo. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es de 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIB que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio Fc de IgG1 humano. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:4; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:4; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) 90% idéntica a SEQ ID NO:7; (f) 95% idéntica a SEQ ID NO:7; (g) 98% idéntica a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) 90% idéntica a SEQ ID NO:8; (j) 95% idéntica a

a SEQ ID NO:8; (k) 98% idéntica a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (n) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (o) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (p) SEQ ID NO:11. El inhibidor de la señalización de ActRIIB conocido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) 90% idéntica a SEQ ID NO:11; (b) 95% idéntica a SEQ ID NO:11; (c) 98% idéntica a SEQ ID NO:11; y (d) SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

5.2 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Se describe aquí un método para tratar la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa en un sujeto que lo necesita, en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRIIB. En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En casos más específicos, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En casos más específicos, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En casos más específicos, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En casos más específicos, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

En casos específicos, el sujeto es un sujeto descrito en la Sección 5.3. En casos específicos, el sujeto es un ser humano. En casos específicos, el sujeto tiene anemia. En casos específicos, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos. En casos específicos, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En casos específicos, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En casos específicos, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81,

82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

5 En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto como parte de una composición. En casos específicos, la composición es una composición descrita en la Sección 5.5.

10 En casos específicos, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis descrita en la Sección 5.6. En casos específicos, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 0,3 mg/kg a 2,0 mg.kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg del inhibidor de la señalización ActRIIB. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto con una frecuencia descrita en la Sección 5.6. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En casos preferidos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días.

15 En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto a través de una vía de administración descrita en la Sección 5.6. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En casos preferidos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea.

20 En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En un caso preferido, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept. En casos específicos, el sujeto es un ser humano.

30 También se describe aquí un método para tratar la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa en un sujeto que lo necesita, en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRIIB, y en el que dicho tratamiento reduce o alivia uno o más síntomas de dicha mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa en dicho sujeto. En casos específicos, el síntoma es uno o más de fatiga, sudores nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad temprana, o dolor óseo. En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En casos más específicos, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En casos específicos, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En casos más específicos, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En casos específicos la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En casos más específicos, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En casos más específicos, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

50 En casos específicos, el sujeto es un sujeto descrito en la Sección 5.3. En casos específicos, el sujeto es un ser humano. En casos específicos, el sujeto tiene anemia. En casos específicos, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos. En casos específicos, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En casos específicos, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En casos específicos, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

60 En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto como parte de una composición. En casos específicos, la composición es una composición descrita en la Sección 5.5.

65 En casos específicos, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis descrita en la Sección 5.6. En casos específicos, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 0,3 mg/kg a 2,0 mg.kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg del inhibidor de la señalización ActRIIB. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto con una frecuencia descrita en

la Sección 56. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En casos preferidos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días.

5 En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto a través de una vía de administración descrita en la Sección 5.6. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En casos preferidos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea.

10 En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En casos específicos, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En un caso preferido, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept. En casos específicos, el sujeto es un ser humano.

Se proporciona aquí un método para tratar la anemia en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de ActRIIB, en el que el sujeto tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa como se define en las reivindicaciones adjuntas. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

En realizaciones específicas, el sujeto es un sujeto descrito en la Sección 5.3. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto como parte de una composición. En realizaciones específicas, la composición es una composición descrita en la Sección 5.5.

En realizaciones específicas, la dosis farmacéuticamente eficaz es una dosis descrita en la Sección 5.6. En realizaciones específicas, la cantidad farmacéuticamente eficaz es 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, por ejemplo 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto con una frecuencia descrita en la Sección 5.6. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días. En realizaciones preferidas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto una vez cada 21 días.

En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto a través de una vía de administración descrita en la Sección 5.6. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía intravenosa o subcutánea. En realizaciones preferidas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea.

En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la

señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

En realizaciones específicas, el sujeto es un sujeto descrito en la Sección 5.3. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto como parte de una composición. En realizaciones específicas, la composición es una composición descrita en la Sección 5.5.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

En realizaciones específicas, el sujeto es un sujeto descrito en la Sección 5.3. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto como parte de una composición. En realizaciones específicas, la composición es una composición descrita en la Sección 5.5.

5 En una realización, el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en el que el polipéptido se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

En realizaciones específicas, el sujeto es un sujeto descrito en la Sección 5.3. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto como parte de una composición. En realizaciones específicas, la composición es una composición descrita en la Sección 5.5.

5.3 POBLACIÓN DE PACIENTES

Los sujetos tratados según los métodos descritos en el presente documento pueden ser cualquier mamífero, tales como roedores y primates, y en una realización preferida, seres humanos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, los métodos descritos aquí se pueden usar para tratar la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa y/o la anemia en cualquier mamífero, tales como roedores y primates, y en una realización preferida, en sujetos humanos.

En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos aquí puede ser de cualquier edad. En ciertas realizaciones, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 18 años. En una realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 13 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 12, menos de 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6 o menos de 5 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene 1-3 años, 3-5 años, 5-7 años, 7-9 años, 9-11 años, 11-13 años, 13-15 años, 15-20 años, 20-25 años, 25-30 años o más de 30 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene 30-35 años, 35-40 años, 40-45 años, 45-50 años, 50-55 años, 55-60 años o más de 60 años. En otra realización específica, el sujeto tratado según los métodos descritos en el presente documento tiene 60-65 años, 65-70 años, 70-75 años, 75-80 años o más de 80 años.

El sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa. En ciertas realizaciones, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por

trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

El sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa y anemia. En ciertas realizaciones, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria. En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2* o una mutación del exón 12 de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis posterior a policitemia vera. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis posterior a policitemia vera está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones específicas, la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial. En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial está asociada con, o es causada por, una mutación de *JAK2*, por ejemplo una mutación V617F de *JAK2*, o una mutación del receptor de trombopoyetina (MPL). En realizaciones más específicas, la mielofibrosis por trombocitopenia esencial o posterior a trombocitemia esencial incluye fibrosis reticulínica o fibrosis tricrómica.

El sujeto tratado según los métodos descritos aquí se ha tratado previamente con ruxolitinib. En una realización específica, un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí ha estado tomando una dosis estable de ruxolitinib durante al menos 112 días inmediatamente antes del tratamiento.

En ciertas realizaciones, un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí es independiente de la transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, un sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si el sujeto no ha recibido (0) unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de una primera administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

En ciertas realizaciones, un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí depende de la transfusión de glóbulos rojos. En realizaciones específicas, un sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de una primera administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.

5.4 INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE ACTRIIB

Como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas de tipo IIB del receptor de activina (ActRIIB) de cualquier especie y variante derivada de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación. Referencia a ActRIIB en el presente documento se entiende que es una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas del receptor. Miembros de la familia ActRIIB son, en general, proteínas transmembranarias, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembranario y un dominio citoplásmico con actividad de serina/treonina cinasa predicha.

Los inhibidores de la señalización de ActRIIB incluyen, sin limitación, polipéptidos ActRIIB solubles que se unen a activina; anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades A o B de activina, también denominadas β A o β B) y alteran la unión de ActRIIB; anticuerpos que se unen a ActRIIB y alteran la unión a activina; proteínas no de anticuerpo seleccionadas para la unión a activina o ActRIIB; y péptidos aleatorizados seleccionados para la unión a activina o ActRIIB, que se pueden conjugar con un dominio Fc.

Dos o más proteínas diferentes (u otras restos) con actividad de unión a activina o a ActRIIB, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (por ejemplo, un receptor de activina de tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir entre sí para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe ActRIIB, y por lo tanto se puede usar en las composiciones y los métodos descritos aquí. casos de antagonistas del eje de señalización activina-ActRIIB que inhiben ActRIIB incluyen aptámeros de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y otros agentes se usan en las composiciones y los métodos descritos aquí incluyen.

5.4.1 Inhibidores de la señalización de ActRIIB que comprenden polipéptidos ActRIIB

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido ActRIIB" se refiere a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido que existe de forma natural de un miembro de la familia de ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas de peptidomimético) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier receptor ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y opcionalmente al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o activina. Un ejemplo de un polipéptido ActRIIB incluye el polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 14). Con respecto al polipéptido precursor ActRIIB cuya secuencia de aminoácidos se representa como SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 (es decir, el polipéptido precursor ActRIIB humano), el péptido señal del polipéptido precursor ActRIIB se encuentra en los aminoácidos 1 a 18; el dominio extracelular se encuentra en los aminoácidos 19 a 134, y los posibles sitios de glicosilación ligados a N se encuentran en las posiciones de aminoácidos 42 y 65. La secuencia del ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano de SEQ ID NO:3 se desvela como SEQ ID NO:6 (SEQ ID NO:6 proporciona una alanina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64, pero en su lugar podría ser fácilmente modificado por un experto en la técnica usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar una arginina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64). Véase la Tabla 2 para una descripción de las secuencias. El inhibidor de la señalización de ActRIIB de la invención se define en las reivindicaciones.

La numeración de aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos aquí se basa en la numeración de aminoácidos para SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 14 (que sólo difieren en el aminoácido expresado en la posición 64), a menos que se indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, si se describe un polipéptido ActRIIB que tiene una sustitución/mutación en la posición de aminoácido 79, entonces se debe entender que la posición 79 se refiere al 79º aminoácido en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, del que deriva el polipéptido ActRIIB. Asimismo, si se describe que un polipéptido ActRIIB tiene una alanina o una arginina en la posición de aminoácido 64, entonces se debe entender que posición 64 se refiere al aminoácido 64º en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, del que deriva el polipéptido ActRIIB.

Los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden polipéptidos que comprenden un dominio de unión a activina de ActRIIB. En algunos casos, los dominios de unión a activina de ActRIIB comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo. En casos específicos, el dominio extracelular o porción del mismo de ActRIIB es soluble. Formas modificadas ilustrativas de polipéptidos ActRIIB se desvelan en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.º 20090005308 y 20100068215. También se describen formas modificadas ilustrativas de polipéptidos ActRIIB en las publicaciones de solicitudes de patente internacionales números WO 2008/097541 y WO 2010/019261.

En casos específicos, los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí son polipéptidos ActRIIB solubles. El término "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere, en general, a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB, que incluye cualquier dominio extracelular que existe de forma natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas de peptidomimético). Los polipéptidos ActRIIB solubles se pueden unir a activina; sin embargo, la proteína ActRIIB natural no presenta selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. En ciertos casos, en los métodos proporcionados aquí se pueden usar formas alteradas de ActRIIB con diferentes propiedades de unión. Tales formas alteradas se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitudes de patente internacionales números WO 2006/012627 y WO 2010/019261. A las proteínas ActRIIB nativas o alteradas se les puede dar especificidad adicional por activina acoplándolas a un segundo agente de unión selectivo por activina. Los polipéptidos ActRIIB solubles ejemplares incluyen el dominio extracelular de un polipéptido ActRIIB humano (por ejemplo, SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 y 29).

Se ha demostrado que una proteína de fusión de Fc que tiene la secuencia extracelular de ActRIIB descrita por Hilden et al. (Blood, 1994, 83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO:3 (aquí en lo sucesivo denominada "A64"), posee una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. Por el contrario, una proteína de fusión de Fc con una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB (aquí en lo sucesivo denominada "R64") tiene una afinidad por activina y GDF-11 en el intervalo nanomolar bajo a picomolar alto (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20100068215). Véase también la publicación internacional n.º WO 2010/019261.

Una secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB con una arginina en la posición 64 se presenta en SEQ ID NO:14. Como tal, en ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos aquí pueden comprender (i) una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 3; o (ii) una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos aquí pueden comprender un aminoácido que no es alanina o arginina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos precursora de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 14.

Se ha demostrado que una delección del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor por la activina (véase, por ejemplo, Attisano et al., Cell, 1992, 68(1):97-108). Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO:14 (es decir, SEQ ID NO:18), "ActRIIB(20-119)-Fc" tiene una unión reducida a GDF-11 y activina con respecto a una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:14 (es decir, SEQ ID NO:17), "ActRIIB(20-134)-Fc", que incluye la región del nudo de prolina y el dominio yuxtamembrana completo. Sin embargo, una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-129 de SEQ ID NO:14, "ActRIIB(20-129)-Fc", conserva una actividad similar pero algo reducida con respecto al dominio extracelular no truncado de ActRIIB, incluso cuando la región del nudo de prolina está interrumpida. Por lo tanto, se espera que los polipéptidos ActRIIB que comprenden dominios extracelulares que se detienen en los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 de SEQ ID NO: 14 (o SEQ ID NO: 3) sean activos, pero los constructos que se detienen en los aminoácidos 134 o 133 pueden ser muy activos. De manera similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los restos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando en grandes márgenes, como lo indica el hecho de que las mutaciones de P129 y P130 de SEQ ID NO: 14 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, los polipéptidos ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos aquí pueden terminar tan pronto como el aminoácido 109 (es decir, la cisteína final) de SEQ ID NO: 14 (o SEQ ID NO:3); sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre las posiciones de aminoácidos 109 y 119 de SEQ ID NO:14 (o SEQ ID NO:3) tengan una capacidad reducida de unión al ligando.

El aminoácido 29 de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:14 representa la cisteína inicial en la secuencia precursora de ActRIIB. Se espera que un polipéptido ActRIIB que empieza en el aminoácido 29 del extremo N de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, o antes de estas posiciones de aminoácidos, retenga la actividad de unión al ligando. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 introduce una secuencia de glucosilación unida a N sin afectar sustancialmente la unión al ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señal y la región de reticulación de cisteína, correspondientes a los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, son bien tolerados. En particular, los polipéptidos ActRIIB que comienzan en la posición de aminoácidos 20, 21, 22, 23 y 24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 conservarán la actividad, y también se espera que los polipéptidos ActRIIB que comienzan en las posiciones de aminoácidos 25, 26, 27, 28 y 29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 mantengan la actividad. Un polipéptido ActRIIB que comienza en la posición de aminoácidos 22, 23, 24 o 25 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 14 tendrá la mayor actividad.

Tomados conjuntamente, las porciones activas (es decir, los polipéptidos ActRIIB) de la proteína precursora ActRIIB (es decir, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14) que se van a usar según los métodos y composiciones descritos en el presente documento comprenderán, en general, los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, y dichos polipéptidos ActRIIB pueden empezar, por ejemplo, en un resto correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 19-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y terminar en una posición correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Los ejemplos específicos de polipéptidos ActRIIB englobados en el presente documento incluyen los que empiezan en una posición de aminoácido desde 19-29, 20-29 o 21-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y terminan en una posición de aminoácido desde 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Otros ejemplos específicos de polipéptidos ActRIIB abarcados aquí incluyen aquellos que comienzan en una posición de aminoácido de 20-24 (o 21-24, o 22-25) de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 y terminan en una posición de aminoácido de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. También se contemplan los polipéptidos ActRIIB de variante que se encuentran dentro de estos intervalos, particularmente los que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia u homología de secuencias con la porción correspondiente de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

En ciertos casos, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB. La truncación puede ser en el extremo carboxi y/o el extremo amino del polipéptido ActRIIB. En ciertos casos, el truncamiento puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos con respecto al dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertos casos, el truncamiento puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos N-terminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. En ciertos casos, el truncamiento puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular del polipéptido ActRIIB maduro. Por ejemplo, formas truncadas de ActRIIB incluyen polipéptidos con los aminoácidos 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; y 25-131, en donde las posiciones de aminoácidos se refieren a las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

Las formas truncadas ejemplares adicionales de ActRIIB incluyen (i) polipéptidos que comienzan en los aminoácidos en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (opcionalmente que comienzan en 22-25 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14) y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (ii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (opcionalmente que comienzan en 22-25 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14) y que

terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14; (iii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (opcionalmente que comienzan en 22-25 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14) y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (iv) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14; (v) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (vi) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (vii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (viii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (ix) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (x) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (xi) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; y (xii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. En un caso específico, un polipéptido ActRIIB comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 y que termina en la posición de aminoácido 131 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. En otro caso específico, un polipéptido ActRIIB consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, o 33.

Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede producirse como un homodímero. Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se puede formular como una proteína de fusión que tiene una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de los polipéptidos ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

En casos específicos, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden un dominio extracelular de ActRIIB con una o más sustituciones/mutaciones de aminoácidos. Dicha sustitución/mutación de aminoácido puede ser, por ejemplo, un intercambio de la leucina en la posición de aminoácido 79 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 a un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. Por ejemplo, la posición L79 de SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO:14 se puede alterar en polipéptidos del dominio extracelular de ActRIIB para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11) alteradas. Las mutaciones L79A y L79P reducen la unión a GDF-11 a un grado mayor que la unión a activina. Las mutaciones L79E y L79D retienen la unión a GDF-11, mientras que se demuestra una unión a activina enormemente reducida.

En ciertos casos, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB que también porta una sustitución de aminoácido, por ejemplo un intercambio de la leucina en la posición de aminoácido 79 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14 a un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. Según las reivindicaciones, la forma truncada de un dominio extracelular del polipéptido ActRIIB que también porta una sustitución de aminoácido usada en las composiciones y métodos descritos aquí es SEQ ID NO:9. Las formas de ActRIIB que están truncadas y/o llevan una o más sustituciones de aminoácidos se pueden unir a un dominio Fc de un anticuerpo como se trata anteriormente.

Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, por cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB. Además, los fragmentos pueden ser sintetizados químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida convencional de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o por síntesis química) y probar para identificar los fragmentos de peptidilo que pueden servir de antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o señalización mediada por activina.

Además, se pueden obtener variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRIIB, por ejemplo, cribando bibliotecas de polipéptidos modificados recombinantemente producidos a partir de los ácidos nucleicos correspondientes mutagenizados que codifican un polipéptido ActRIIB. Las variantes se pueden producir y probar para identificar aquellas que pueden servir de antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o señalización mediada por activina. En ciertos casos, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, y 29. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia

de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, y 29.

Se pueden generar variantes funcionales, por ejemplo, modificando la estructura de un polipéptido ActRIIB para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica, o estabilidad (por ejemplo, vida útil *ex vivo* y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos ActRIIB modificados, cuando se seleccionan para retener la unión a activina, son considerados equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIB que existen de forma natural. Los polipéptidos ActRIIB modificados también se pueden producir, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente (por ejemplo, mutaciones conservativas) no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRIIB de variante para producir una respuesta en células en un modo similar al polipéptido ActRIIB no mutante.

Los mutantes del polipéptido ActRIIB, particularmente los conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRIIB, así como los mutantes de truncamiento, los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales, y se pueden usar en los métodos y composiciones descritos aquí. El fin de cribar dichas bibliotecas combinatorias puede ser para generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos ActRIIB que pueden servir o de agonistas o antagonistas, o alternatively, poseer actividades novedosas en conjunto.

Se ha demostrado que el bolsillo de unión al ligando de ActRIIB está definido por los restos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92, y E94 a F 101 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14. En estas posiciones, se espera que las mutaciones conservativas sean toleradas, aunque una mutación K74A es bien tolerada, ya que son R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es K en *Xenopus*, que indica que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus*, y por lo tanto los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para un polipéptido ActRIIB para uso en los métodos y composiciones descritos aquí es aquella que comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14, pero opcionalmente comenzando en una posición de aminoácido que oscila de 20-24 o 22-25 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 y que termina en una posición de aminoácido que oscila de 129-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, y que comprende no más de 1, 2, 5, o 15 cambios de aminoácidos conservativos en el bolsillo de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones de aminoácidos 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 en el bolsillo de unión al ligando. Dicho polipéptido ActRIIB puede retener más de 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia u homología de secuencias con la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Los sitios fuera del sitio de unión, en los que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular de ActRIIB, y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (N65A) mejora en realidad la unión a ligando en el acervo de A64, y así se espera que no tenga efecto perjudicial sobre la unión a ligando en el acervo de R64. Este cambio elimina probablemente la glucosilación en N65 en el acervo de A64, demostrándose así que es probable que sea tolerado un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio de R64A es mal tolerado, R64K es bien tolerado, y así otro resto básico, tal como H, puede ser tolerado en la posición 64.

Como un ejemplo específico de un polipéptido ActRIIB con una mutación en el dominio de unión a ligando, el resto de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB se puede mutar a un resto de aminoácido diferente de forma que el polipéptido ActRIIB de variante se una preferentemente a GDF8, pero no a activina. En un caso específico, el resto D80 se cambia por un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un resto de aminoácido no cargado, un resto de aminoácido negativo, y un resto de aminoácido hidrófobo. Como un ejemplo específico adicional, el resto hidrófobo L79 se puede alterar a los aminoácidos ácidos aspártico o glutámico para reducir enormemente la unión a activina, mientras que se retiene la unión a GDF11. Como reconocerá un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas se pueden hacer al nivel del ácido nucleico o, en algunos casos, por modificación postraducciona o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica.

En casos específicos, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden un conjugado/proteína de fusión que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a activina) de un receptor ActRIIB unido a una porción Fc de un anticuerpo. Tales conjugados/proteínas de fusión pueden comprender cualquiera de los polipéptidos ActRIIB descritos aquí (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs:17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33), cualesquiera polipéptidos ActRIIB conocidos en la técnica, o cualesquiera polipéptidos ActRIIB generados usando métodos conocidos en la técnica y/o proporcionados aquí.

En ciertos casos, el dominio extracelular está unido a una porción Fc de un anticuerpo a través de un enlazador, por ejemplo un enlazador peptídico. Los conectores a modo de ejemplo incluyen secuencias de polipéptidos cortas, tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 restos de aminoácidos (por ejemplo, restos de glicina), tales como, por ejemplo, un conector Gly-Gly-Gly. En un caso específico, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly (GGG). En otro caso específico, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos Thr-Gly-Gly-Gly (TGGG). Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en restos tales como Asp-265, lisina 322, y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse al receptor Fcγ con respecto a un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, una mutación de Asn-434) tiene un aumento de la capacidad para unirse al receptor de Fc relacionado con la clase I del MHC (FcRN) con respecto a un dominio Fc no mutante. Las proteínas de fusión ejemplares que comprenden un dominio extracelular soluble de ActRIIB fusionado a un dominio Fc, como se establecen en SEQ ID NOs:20, 21, 24, 25 o 34.

En un caso específico, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en el que dicho inhibidor de la señalización de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:20, 21, 24, 25, 34. En otro caso específico, los inhibidores de la señalización de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos aquí comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en el que dicho inhibidor de la señalización de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:20, 21, 24, 25, y 34.

En un caso específico, el inhibidor de la señalización de ActRIIB a usar en las composiciones y métodos descritos aquí es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1. En otro caso específico, el inhibidor de la señalización de ActRIIB a usar en las composiciones y métodos descritos aquí es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1. En otro caso específico, el inhibidor de la señalización de ActRIIB a usar en las composiciones y métodos descritos aquí es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en el que el dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano posee una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 79 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. En una realización, la sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 79 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 es una sustitución de leucina por ácido aspártico (es decir, una mutación L79D).

En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB a usar en las composiciones y métodos descritos aquí es SEQ ID NO:10 o 11, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en el que dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:14 con una mutación L79D. La secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ActRIIB-Fc de SEQ ID NO:10 se presenta en SEQ ID NO:31.

En otro caso específico, el inhibidor de la señalización de ActRIIB a usar en las composiciones y métodos descritos aquí es SEQ ID NO:20 o 21, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en el que dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:3 con una mutación L79D.

Los sitios de reconocimiento de la glucosilación unidos a asparagina comprenden, en general, una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocida específicamente por enzimas de glucosilación celular apropiadas. La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más de restos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB no mutante (para sitios de glucosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de la glucosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) produce la no glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de restos de hidrato de carbono en un polipéptido ActRIIB es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con el polipéptido ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en la solicitud de patente internacional N.º WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. La retirada de uno o más restos de hidrato de carbono presentes en un polipéptido ActRIIB se puede llevar a cabo química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe además por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. La

escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en polipéptidos ActRIIB se puede lograr usando una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRIIB puede ser posterior, según corresponda, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, de levadura, de insectos y de plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para su uso en seres humanos se expresarán en una estirpe celular de mamífero que proporciona la glicosilación apropiada, tales como las estirpes celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que sean útiles otros sistemas de expresión, tales como otras estirpes celulares de expresión en mamífero, estirpes celulares de levadura con enzimas de glicosilación manipuladas y células de insecto.

En casos específicos, los polipéptidos ActRIIB mutados que comprenden la adición de un sitio de glicosilación ligado a N adicional (N-X-S/T) que aumenta la vida media sérica de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, con respecto a la forma ActRIIB(R64)-Fc, se pueden usar en los métodos y composiciones descritos aquí. En un caso específico, la introducción de una asparagina en la posición 24 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (A24N) da como resultado la creación de una secuencia NXT que confiere una vida media más larga. Otras secuencias NX(T/S) se pueden encontrar en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque la última puede no estar eficientemente glucosilada con R en la posición 64 (es decir, en polipéptidos R64). Las secuencias N-X-S/T pueden ser introducidas, en general, en las posiciones fuera del sitio de unión al ligando de ActRIIB, que se detalla anteriormente. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134 de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el conector entre la secuencia ActRIIB y el componente de fusión Fc u otro. Dicho sitio se puede introducir con esfuerzo mínimo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o introduciendo un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por lo tanto, alteraciones deseables que crearían un sitio de glucosilación unido al N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinadas con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T (pudiéndose encontrar todas las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14). Cualquier S que se prediga que está glucosilado se puede alterar a un T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección proporcionada por la glucosilación. Asimismo, cualquier T que se prediga que está glucosilado se puede alterar a un S. Así, las alteraciones S67T y S44T están englobadas en el presente documento. Asimismo, en una variante de A24N, se puede usar una alteración de S26T. Por consiguiente, un polipéptido ActRIIB puede incluir una o más secuencias consenso de glucosilación unidas a N no endógenas adicionales.

Se puede usar una variedad de ensayos de cribado para evaluar las variantes de polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, se puede cribar una variante de polipéptido ActRIIB para la capacidad para unirse a un ligando de ActRIIB, para prevenir la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB, o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIB. La actividad de un polipéptido ActRIIB o sus variantes también se pueden probar en un ensayo basado en células o *in vivo*.

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o, en general, elevada con respecto a un polipéptido ActRIIB que existe de forma natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares espectacularmente diferentes a las del polipéptido ActRIIB no mutante correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que producen la destrucción de, o inactivación de otro modo de un polipéptido ActRIIB nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptidos ActRIIB modulando la semivida de los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una corta semivida puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptidos ActRIIB recombinante en el sujeto. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden hacer en el conector (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria a modo de una biblioteca de genes degenerada que codifica una biblioteca de polipéptidos que incluye cada una al menos una porción de posibles secuencias de polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ser unida enzimáticamente en secuencias de genes de forma que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIB sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación en fagos).

Existen muchas formas por las que la biblioteca de posibles homólogos se puede generar a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos se unen entonces en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Ámsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Estas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véanse, por ejemplo, Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las patentes de EE. UU. N.º 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, las variantes del polipéptido ActRIIB se pueden generar y aislar a partir de una biblioteca mediante un cribado usando, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina y similares (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; and Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), por mutagénesis de barrido de enlace (Gustin et al., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) *Science* 232:316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); por mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o por mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). Las mutagénesis por barrido de conectores, particularmente en un ámbito combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRIIB.

Se conoce en la técnica un amplio intervalo de técnicas para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales y truncaciones, y, en este caso, para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una cierta propiedad. Dichas técnicas serán adaptables, en general, para el rápido cribado de bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRIIB. Las técnicas más ampliamente usadas para cribar grandes bibliotecas de genes comprenden normalmente clonar las bibliotecas de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita de forma relativamente fácil el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización de células mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden comprender además modificaciones postraduccionales, además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRIIB modificados pueden contener elementos no de aminoácido, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o mono-sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no de aminoácido sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRIIB se pueden probar por cualquier método conocido por el experto. Cuando un polipéptido ActRIIB se produce en células por escisión de una forma naciente del polipéptido ActRIIB, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Células diferentes (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos ActRIIB.

En ciertos aspectos, variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina de suero humano. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el fin 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 dichas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con componentes de fusión (HIS6). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRIIB. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como "marcas de epítopes," que son secuencias de péptidos normalmente cortas para las que un anticuerpo específico está disponible. Las marcas de epítopes bien conocidas para las que los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen marcas FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el factor Xa o trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo libere las proteínas recombinantes de allí. Las proteínas liberadas se pueden aislar entonces del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En ciertos casos preferidos, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se indica algo que aumenta la semivida en suero, independientemente de si esto es debido a una reducción de la destrucción, una depuración reducida por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Se conoce que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio intervalo de proteínas. Asimismo, las fusiones con la albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como estimulación adicional del crecimiento óseo o crecimiento muscular, según se desee).

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer en cualquier modo que esté de acuerdo con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB se puede poner carboxiterminal a un dominio heterólogo, o, alternatively, un dominio heterólogo se puede poner carboxiterminal a un polipéptido ActRIIB. El dominio del polipéptido ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y dominios o secuencias de aminoácidos adicionales se pueden incluir carboxi- o aminoterminal a cualquier dominio o entre los dominios.

En ciertos casos, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos aquí contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRIIB. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRIIB, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones estabilizantes incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluyendo, por ejemplo, adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRIIB) y modificaciones del resto de hidrato de carbono (incluyendo, por ejemplo, retirada de restos de hidrato de carbono de un polipéptido ActRIIB). En el caso de proteínas de fusión, un polipéptido ActRIIB se fusiona con un dominio estabilizador, tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc), como en el caso de proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteináceas, tales como un resto de hidrato de carbono, o polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol.

En ciertos casos, los métodos y composiciones descritos aquí usan polipéptidos ActRIIB aislados o purificados, es decir, polipéptidos ActRIIB que están aislados de, o de otro modo sustancialmente libres de, otras proteínas, se pueden usar con los métodos y composiciones descritos aquí. Los polipéptidos ActRIIB se producirán, en general, por expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento están codificados por ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes, que incluyen fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión desveladas en el presente documento. Por ejemplo, SEQ ID NO: 6 codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano que existen de forma natural. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para obtener polipéptidos ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende además que los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos aquí incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEQ ID NO:6, así como variantes de aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 y 29). Las secuencias de nucleótidos de variante incluyen secuencias que se diferencian en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En ciertos casos, las secuencias de ácidos nucleicos aislados o recombinantes que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos aquí son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID NO:6 o aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 y 29). Un experto en la técnica apreciará que las secuencias del ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO:6 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, y 29), y variantes de SEQ ID NO:6 o aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 y 29) se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En otras realizaciones, las secuencias del ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

En otros casos, los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos aquí incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente rigurosas con la secuencia nucleotídica designada en SEQ ID NO:6 o aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, y 29), secuencia complementaria de SEQ ID NO:6 o aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 y 29), o fragmentos de las mismas. Un experto habitual en la técnica entenderá que se pueden variar las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación con 6,0 veces cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45° Celsius, seguido de un lavado de 2,0 veces SSC a 50° Celsius. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de alrededor de 2,0 veces SSC a 50°

Celsius hasta una rigurosidad alta de alrededor de 0,2 veces SSC a 50° Celsius. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22° Celsius, hasta condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65° Celsius. Se pueden variar tanto la temperatura como la sal, o se puede mantener constante la temperatura o concentración de sales mientras se cambia la otra variable. En una realización, los ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 veces SSC a temperatura ambiente seguido por un lavado a 2 veces SSC a temperatura ambiente se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Los ácidos nucleicos aislados que se diferencian de los ácidos nucleicos como se exponen en SEQ ID NO: 6 o aquellas secuencias del ácido nucleico que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, y 29) debido a la degeneración en el código genético también se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos aquí. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto existan entre las células de mamífero. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

En ciertos casos, los ácidos nucleicos recombinantes que se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos aquí pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias nucleotídicas reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán, en general, apropiadas para la célula hospedadora usada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células hospedadoras. Normalmente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias conductoras o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias traduccionales de inicio y terminación y secuencias potenciadoras o activadoras. En el presente documento se pueden usar promotores constitutivos o inducibles como se conoce en la técnica con los métodos y composiciones descritos. Los promotores pueden ser o promotores que existen de forma natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión se puede insertar en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de marcadores de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que se puedan usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento se proporcionan en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRIIB y está unida operativamente unida a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRIIB. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Las secuencias reguladoras a modo de ejemplo se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se une operativamente en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRIIB. Tales secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, las regiones principales del operador y promotor del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo Pho5, los promotores de la levadura alfa. - factores de apareamiento, el promotor poliédrico del sistema de baculovirus, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debería considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibiótico.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante uniendo el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en cualquier célula procariota, célula eucariota (levadura, aviar, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido ActRIIB 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, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariota que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y resistencia a la selección de fármacos en tanto células procariotas como eucariotas. Alternativamente, derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (VPB-1) o 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 (incluyendo retrovíricos) se pueden encontrar en la siguiente descripción de sistemas de administración de genoterapia. Se conocen bien en la técnica diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3.^a edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, se puede desear expresar los polipéptidos recombinantes usando un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tal como pVL1392, pVL 1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tal como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tal como el pBlueBac III que contiene .beta.-gal).

En una realización, se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores de pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores de pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como será evidente, los constructos genéticos en cuestión se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos ActRIIB en cuestión en células propagadas en cultivo, por ejemplo para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

Células hospedadoras transfectadas con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 6 o aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ActRIIB solubles (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NOs: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 y 29)) para uno o más de los polipéptidos ActRIIB en cuestión se pueden usar para producir polipéptidos ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos aquí. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), de levadura, o células de mamíferos. Los expertos en la técnica conocen otras células hospedadoras adecuadas.

En consecuencia, se proporcionan aquí métodos para producir los polipéptidos ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos aquí. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIB se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido ActRIIB. El polipéptido ActRIIB se puede secretar y aislar de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido ActRIIB puede ser retenido citoplásmicamente o en una fracción de membrana y las células se recogen, lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Se conocen bien en la técnica medios adecuados para el cultivo celular. Los polipéptidos ActRIIB en cuestión se pueden aislar del medio de cultivo celular, de las células hospedadoras, o de ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmovinoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIB, y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ActRIIB (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIB-Fc). En un caso preferido, el polipéptido ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En un caso preferido, la purificación se logra mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de sefarsa Q, cromatografía de fenilsefarsa, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría ser completada con filtración vírica e intercambio de tampón. Como se demuestra en el presente documento, se purificó la proteína ActRIIB-hFc hasta una pureza de >98% como se ha determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% como se ha determinado por SDS-PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otro caso, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enterocinas en el extremo N de la porción deseada del polipéptido ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina metálica Ni²⁺. La secuencia líder de purificación puede eliminarse después mediante tratamiento con

enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRIIB purificado (por ejemplo, véanse Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Se conocen bien las técnicas de preparación de genes de fusión. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o de terminación escalonada para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según convenga, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión no deseable y unión enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por 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 se pueden unir posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

La proteína de fusión ActRIIB-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX BI 1 establemente transfectadas de un vector pAID4 (ori/potenciador del SV40, promotor del CMV), usando una secuencia conductora de plasminógeno tisular de SEQ ID NO:2. La porción Fc puede comprender una secuencia Fc de IgG1 humana, como se muestra en SEQ ID NO: 1. En ciertos casos, tras la expresión, la proteína contenida tiene, en promedio, entre alrededor de 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIB-Fc.

En ciertos casos, la larga vida media sérica de una fusión ActRIIB-Fc puede ser 25-32 días en sujetos humanos. Además, el material expresado en células CHO puede tener una mayor afinidad por el ligando de activina B que el informado para una proteína de fusión ActRIIB-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35). Además, sin estar limitados por la teoría, el uso de la secuencia líder TPA proporcionó una mayor producción que otras secuencias líderes, y a diferencia de ActRIIB-Fc expresada con un líder nativo, puede proporcionar una secuencia N-terminal altamente pura. El uso de la secuencia conductora nativa puede producir dos especies importantes de ActRIIB-Fc, cada una de las cuales tiene una secuencia aminoterminal diferente.

En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept (véanse las Denominaciones Comunes Internacionales para Sustancias Farmacéuticas (DCI), Información sobre Medicamentos de la OMS, vol. 27, n.º 4, 2013, DCI propuesta: Lista 110-458, 422).

5.5 COMPOSICIONES

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la señalización de ActRIIB se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso con los métodos descritos aquí. Por ejemplo, un inhibidor de la señalización de ActRIIB se puede administrar solo o como componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto se pueden formular para administración en cualquier modo conveniente para su uso en medicina o veterinaria.

En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRII se formula para administración subcutánea.

En otra realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se envasa en un recipiente como un polvo o torta liofilizada estéril y sin conservantes. En ciertas realizaciones, el recipiente comprende 25 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, el recipiente que comprende 25 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB comprende un total de 37,5 mg de proteína. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB en el recipiente que comprende 25 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB se reconstituye con 0,68 ml de agua para inyección. En ciertas realizaciones, el recipiente comprende 75 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, el recipiente que comprende 75 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB comprende un total de 87,5 mg de proteína. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB en el recipiente que comprende 75 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB se reconstituye con 1,6 ml de agua para inyección. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB en el recipiente se reconstituye con un volumen de agua para inyección, de modo que la concentración final del inhibidor de la señalización de ActRIIB reconstituido en el agua para inyección es 50 mg/ml con un pH de aproximadamente 6,5. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra a un sujeto dentro de las 10 horas posteriores a la reconstitución. En ciertas realizaciones, el recipiente comprende el inhibidor de la señalización de ActRIIB a una concentración de 50 mg/ml en una disolución 10 mM a base de amortiguador de citrato, en el que la disolución 10 mM a base de amortiguador de citrato comprende citrato 10 mM, pH 6,5, 9 % de sacarosa y 0,02 % de polisorbato 80. En ciertas realizaciones, el recipiente se almacena entre 2 °C y 8 °C. En ciertas realizaciones, el recipiente se almacena entre 2 °C y 8 °C durante 18 meses. En ciertas realizaciones, el recipiente es un vial de vidrio de 3 ml con un tapón recubierto de butilo gris. En ciertas realizaciones, el recipiente es un vial de vidrio de 3 ml con un tapón de goma gris. En ciertas realizaciones, el tapón de goma se fija en su lugar mediante una tapa abatible de aluminio engarzada, con un botón de plástico de color. En ciertas realizaciones, el vial de vidrio de 3 ml comprende 25 mg del inhibidor de la señalización de ActRIIB, y el botón de plástico de color es rojo. En ciertas realizaciones, el vial de vidrio de 3 ml comprende 75 mg del inhibidor de señalización de ActRIIB,

y el botón de plástico de color es blanco. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11.

En una realización específica, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se envasa en un recipiente como un polvo o torta liofilizada estéril y sin conservantes. En una realización específica, el recipiente comprende 50 mg/ml de inhibidor de señalización de ActRIIB en un amortiguador de citrato 10 mM, pH 6,5. En una realización específica, el recipiente comprende 56 mg de inhibidor de señalización de ActRIIB, 0,19 mg de ácido cítrico monohidratado, 3,03 mg de citrato trisódico deshidratado, 0,24 mg de polisorbato 80, y 100,80 mg de sacarosa. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11.

En ciertas realizaciones, los métodos terapéuticos proporcionados aquí incluyen administrar la composición (que comprende un inhibidor de la señalización de ActRIIB) sistémicamente, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para los usos proporcionados en el presente documento está en una forma fisiológicamente aceptable y libre de pirógenos. Se pueden administrar de manera simultánea o secuencial con los compuestos en cuestión agentes terapéuticamente útiles distintos de los inhibidores de la señalización de ActRIIB que también pueden incluirse opcionalmente en la composición como se describió anteriormente (por ejemplo, polipéptidos ActRII, tales como polipéptidos ActRIIA y/o ActRIIB).

Normalmente, los inhibidores de la señalización de ActRIIB se administrarán por vía parenteral. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administrará por vía subcutánea. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRIIB en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, 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 para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede garantizar por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico, y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB está sustancialmente puro en una composición farmacéutica. Específicamente, como máximo el 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,1%, o como máximo el 0,05% de los compuestos en la composición farmacéutica son compuestos distintos del inhibidor de la señalización de ActRIIB y el vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra a temperatura ambiente a un paciente según un método proporcionado aquí.

5.6 DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

También se proporcionan aquí dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB para administrar a un sujeto en relación con un método de tratamiento descrito aquí (véase, por ejemplo, la Sección 5.2). En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis farmacéuticamente eficaz.

En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es una dosis suficiente para reducir o paliar uno o más síntomas de la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es una dosis suficiente para evitar que empeore al menos un síntoma de mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa. Los ejemplos no limitativos de mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa incluyen fatiga, sudores

nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad precoz, o dolor óseo.

En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es una dosis suficiente para reducir o paliar uno o más síntomas de anemia causada por o asociada con mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es una dosis suficiente para prevenir que empeore al menos un síntoma de la anemia. Los ejemplos no limitantes de anemia incluyen cansancio, pérdida de energía, latidos rápidos, disnea, cefaleas, dificultad para concentrarse, mareos, piel pálida, calambres en las piernas e insomnio.

En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es una dosis suficiente para reducir o paliar uno o más síntomas de anemia y uno o más síntomas de mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRII es una dosis suficiente para evitar que al menos un síntoma de anemia empeore y que al menos un síntoma de mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa empeore. Los ejemplos no limitantes de anemia incluyen cansancio, pérdida de energía, latidos rápidos, disnea, cefaleas, dificultad para concentrarse, mareos, piel pálida, calambres en las piernas e insomnio. Los ejemplos no limitativos de mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa incluyen fatiga, sudores nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad precoz, o dolor óseo.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB se dosifica a intervalos y en cantidades suficientes para alcanzar concentraciones séricas de 0,2 mg/kg o mayores, por ejemplo niveles séricos de 1 mg/kg o 2 mg/kg o mayores. Los regímenes de dosificación se pueden diseñar para alcanzar concentraciones séricas de entre 0,2 y 15 mg/kg, y opcionalmente entre 1 y 5 mg/kg. En seres humanos, se pueden alcanzar niveles séricos de 0,2 mg/kg con una dosis única de 0,1 mg/kg o mayor, y se pueden alcanzar niveles séricos de 1 mg/kg con una dosis única de 0,3 mg/kg o mayor. La semivida en suero observada de la molécula es entre aproximadamente 20 y 30 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión de Fc, y así se puede lograr un nivel en suero eficaz sostenido, por ejemplo, por administración de 0,2-0,4 mg/kg semanalmente o cada dos semanas, o se pueden usar dosis más altas con intervalos más largos entre administraciones. Por ejemplo, dosis de 1-3 mg/kg se podrían usar mensualmente o cada dos meses, y el efecto sobre el hueso puede ser suficientemente duradero de forma que la administración sea necesaria solo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses. Los niveles séricos del inhibidor de la señalización de ActRIIB se pueden medir por medios conocidos por el experto. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos contra el inhibidor de la señalización de ActRIIB para determinar los niveles séricos del inhibidor de la señalización de ActRIIB usando, por ejemplo, un ELISA. En una realización específica, el método proporcionado en el presente documento también logra efectos significativos sobre la densidad ósea y la resistencia.

En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es alrededor de 0,1 mg/kg, alrededor de 0,3 mg/kg, alrededor de 0,45 mg/kg, alrededor de 0,5 mg/kg, alrededor de 0,6 mg/kg, 0,75 mg/kg, alrededor de 0,8 mg/kg, alrededor de 1,0 mg/kg, alrededor de 1,25 mg/kg, alrededor de 1,33 mg/kg, alrededor de 1,5 mg/kg, alrededor de 1,75 mg/kg, alrededor de 2,0 mg/kg, o alrededor de 2,25 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,1 mg/kg y 2,25 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,1 mg/kg y 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,3 mg/kg y 1,25 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,5 mg/kg y 1,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,1 mg/kg y 2,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,33 mg/kg y 2,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,75 mg/kg y 1,0 mg/kg, entre 1,0 mg/kg y 1,25 mg/kg, entre 1,25 mg/kg y 1,5 mg/kg, entre 1,5 mg/kg y 1,75 mg/kg, o entre 1,75 mg/kg y 2,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es una dosis farmacéuticamente eficaz. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,45 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,6 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,8 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,75 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 2,00 mg/kg. Cuando se usa junto con una dosis proporcionada aquí (por ejemplo, una dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB o una dosis de un segundo agente activo), la palabra "alrededor de" se refiere a cualquier número dentro del 1, 5 o 10 % del número citado.

En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es una dosis farmacéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB es alrededor de 0,1 mg/kg, alrededor de 0,3 mg/kg, alrededor de 0,45 mg/kg, alrededor de 0,5 mg/kg, alrededor de 0,6 mg/kg, 0,75 mg/kg, alrededor de 0,8 mg/kg, alrededor de 1,0 mg/kg, alrededor de 1,25 mg/kg, alrededor de 1,33 mg/kg, alrededor de 1,5 mg/kg, alrededor de 1,75 mg/kg, alrededor de 2,0 mg/kg, o alrededor de 2,25 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,1 mg/kg y

2,25 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,1 mg/kg y 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,3 mg/kg y 1,25 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,5 mg/kg y 1,5 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,1 mg/kg y 2,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,33 mg/kg y 2,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,75 mg/kg y 1,0 mg/kg, entre 1,0 mg/kg y 1,25 mg/kg, entre 1,25 mg/kg y 1,5 mg/kg, entre 1,5 mg/kg y 1,75 mg/kg, o entre 1,75 mg/kg y 2,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,45 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,6 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,8 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,75 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 2,00 mg/kg.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para aumentar el nivel de hemoglobina en el sujeto en comparación con el nivel de hemoglobina en el sujeto al inicio. En el contexto de la evaluación del aumento del nivel de hemoglobina en el sujeto, "al inicio" se refiere al momento inmediatamente anterior a la primera administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para aumentar el nivel de hemoglobina en el sujeto en al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% durante cualquier período consecutivo de 84 días después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en las que al sujeto se le han transfundido 0 unidades de glóbulos rojos durante el período consecutivo de 84 días, en comparación con el nivel de hemoglobina en el sujeto al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para aumentar el nivel de hemoglobina en el sujeto en como máximo 5%, como máximo 10%, como máximo 15%, como máximo 20%, como máximo 25%, como máximo 30%, como máximo 35%, como máximo 40%, como máximo 45%, como máximo 50%, como máximo 55%, como máximo 60%, como máximo 65%, como máximo 70%, como máximo 75%, como máximo 80%, como máximo 85%, como máximo 90%, como máximo 95%, o como máximo 100% durante cualquier período consecutivo de 84 días después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en las que al sujeto se le han transfundido 0 unidades de glóbulos rojos durante el período consecutivo de 84 días, en comparación con el nivel de hemoglobina en el sujeto al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para aumentar el nivel de hemoglobina en al menos 1,5 g/dl, al menos 1,8 g/dl, al menos 2,0 g/dl, al menos 2,2 g/dl, al menos 2,4 g/dl, al menos 2,6 g/dl, al menos 2,8 g/dl, al menos 3,0 g/dl, al menos 3,2 g/dl, al menos 3,4 g/dl, al menos 3,6 g/dl, al menos 3,8 g/dl, al menos 4,0 g/dl, al menos 5,0 g/dl, o al menos 6,0 g/dl durante cualquier período consecutivo de 84 días después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en las que al sujeto se le han transfundido 0 unidades de glóbulos rojos durante el período consecutivo de 84 días, en comparación con el nivel de hemoglobina en el sujeto al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para aumentar el nivel de hemoglobina en como máximo 1,5 g/dl, como máximo 1,8 g/dl, como máximo 2,0 g/dl, como máximo 2,2 g/dl, como máximo 2,4 g/dl, como máximo 2,6 g/dl, como máximo 2,8 g/dl, como máximo 3,0 g/dl, como máximo 3,2 g/dl, como máximo 3,4 g/dl, como máximo 3,6 g/dl, como máximo 3,8 g/dl, como máximo 4,0 g/dl, como máximo 5,0 g/dl, o como máximo 6,0 g/dl durante cualquier período consecutivo de 84 días después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en las que el sujeto ha recibido una transfusión de 0 unidades de glóbulos rojos durante el período consecutivo de 84 días, en comparación con el nivel de hemoglobina en el sujeto al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para provocar un aumento en el nivel de hemoglobina en el sujeto durante al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 12, al menos 18, al menos 24 o al menos 48 meses después de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para provocar un aumento del nivel de hemoglobina en el sujeto de forma indefinida después de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,33 mg/kg y 2,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,45 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,6 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,8 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,33 mg/kg. En una realización específica, la

dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,75 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 2,00 mg/kg. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept.

En ciertas realizaciones en las que el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para dar como resultado la independencia de la transfusión de glóbulos rojos en el sujeto durante cualquier período consecutivo de 84 días después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, un sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si el sujeto ha recibido 0 unidades de glóbulos rojos durante cualquier período consecutivo de 60 días, 61 días, 62 días, 63 días, 64 días, 65 días, 66 días, 67 días, 68 días, 69 días, 70 días, 71 días, 72 días, 73 días, 74 días, 75 días, 76 días, 77 días, 78 días, 79 días, 80 días, 81 días, 82 días, 83 días, 84 días, 85 días, 86 días, 87 días, 88 días, 89 días, o 90 días. En ciertas realizaciones, un sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 días antes de una primera administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para dar como resultado la independencia de la transfusión de glóbulos rojos en el sujeto durante al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 12, al menos 18, al menos 24 o al menos 48 meses después de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para dar como resultado la independencia de la transfusión de glóbulos rojos en el sujeto de forma indefinida después de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,33 mg/kg y 2,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,45 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,6 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,8 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,75 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 2,00 mg/kg. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para disminuir la frecuencia de transfusión de glóbulos rojos en el sujeto en comparación con la frecuencia de transfusión de glóbulos rojos en el sujeto al inicio. En el contexto de la evaluación de la disminución de la frecuencia de transfusión de glóbulos rojos en el sujeto, "al inicio" se refiere al momento inmediatamente anterior a la primera administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. Para evaluar la disminución en la frecuencia de transfusión de glóbulos rojos en el sujeto en comparación con la frecuencia de transfusión de glóbulos rojos en el sujeto al inicio, se compara el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB con el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí es suficiente para reducir el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 100%, en comparación con el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí es suficiente para reducir el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB en como máximo 10%, como máximo 20%, como máximo 30%, como máximo 40%, como máximo 50%, como máximo

60%, como máximo 70%, como máximo 80%, como máximo 90%, o como máximo 100%, en comparación con el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí es suficiente para reducir el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 unidades, en comparación con el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto tratado según los métodos proporcionados aquí es suficiente para reducir el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB en como máximo 1, como máximo 2, como máximo 3, como máximo 4, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7 o como máximo 8 unidades, en comparación con el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas en el sujeto durante un período de cuatro semanas al inicio. En ciertas realizaciones, una unidad de glóbulos rojos se refiere a alrededor de 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 100-200 ml, 150-250 ml, 200-300 ml, 250-300 ml o 250-350 ml de glóbulos rojos. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,33 mg/kg y 2,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,45 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,6 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,8 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,75 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 2,00 mg/kg. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept.

En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para disminuir la carga de transfusión en el sujeto en al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% durante cualquier período de tiempo después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en comparación con la carga de transfusión en el sujeto al inicio. En el contexto de la evaluación de la disminución de la carga de transfusión en el sujeto, "al inicio" se refiere al momento inmediatamente anterior a la primera administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para disminuir la carga de transfusión en el sujeto en como máximo 5%, como máximo 10%, como máximo 15%, como máximo 20%, como máximo 25%, como máximo 30%, como máximo 35%, como máximo 40%, como máximo 45%, como máximo 50%, como máximo 55%, como máximo 60%, como máximo 65%, como máximo 70%, como máximo 75%, como máximo 80%, como máximo 85%, como máximo 90%, como máximo 95%, o como máximo 100% durante cualquier período de tiempo después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en comparación con la carga de transfusión en el sujeto al inicio. En ciertas realizaciones, el período de tiempo durante el cual se reduce la carga de transfusión en el sujeto es al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, o al menos 12 semanas. En ciertas realizaciones, el período de tiempo durante el cual se reduce la carga de transfusión en el sujeto es 12 semanas (es decir, 84 días). En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para disminuir la carga de transfusión en el sujeto en al menos 50% durante cualquier período consecutivo de 84 días después de que se le haya administrado al sujeto una primera dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en comparación con la carga de transfusión en el sujeto al inicio. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para disminuir la carga de transfusión en el sujeto durante al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 11, al menos 18, al menos 24 o al menos 48 meses después de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, la dosis de un inhibidor de la señalización de ActRIIB administrada a un sujeto según los métodos proporcionados aquí es suficiente para disminuir la carga de transfusión en el sujeto de forma indefinida después de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB está entre 0,33 mg/kg y 2,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,45 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,6 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 0,8 mg/kg. En una

realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,0 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,33 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 1,75 mg/kg. En una realización específica, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB es 2,00 mg/kg. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un inhibidor de la señalización de ActRIIB descrito en la Sección 5.4. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept.

En ciertas realizaciones, se mide la respuesta de la anemia. En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con el aumento de hemoglobina (Hgb), por ejemplo la proporción de sujetos que logran un aumento de hemoglobina $\geq 1,5$ g/dl desde el inicio durante cualquier período consecutivo de 84 días sin una transfusión de glóbulos rojos (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con el aumento de la independencia de la transfusión de glóbulos rojos (RBC), por ejemplo la proporción de sujetos que quedan libres de transfusiones de glóbulos rojos durante cualquier período consecutivo de 84 días (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con el tiempo hasta la respuesta de la anemia, por ejemplo el tiempo desde la primera dosis de luspatercept hasta la primera aparición de la respuesta de la anemia (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con la duración de la respuesta de la anemia, por ejemplo la duración máxima de la respuesta de la anemia en sujetos (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con la frecuencia de transfusiones de glóbulos rojos, por ejemplo el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas por sujeto cada cuatro semanas (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con la frecuencia de la dependencia de la transfusión de glóbulos rojos, por ejemplo la proporción de sujetos dependientes de la transfusión de glóbulos rojos que reducen su carga de transfusión en $\geq 50\%$ desde el inicio durante cualquier período consecutivo de 84 días (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con la proporción de sujetos que logran una reducción en el síntoma de fatiga, según lo registrado y evaluado a través del Formulario de Evaluación de Síntomas de Neoplasia Mieloproliferativa modificado (MPN-SAF), (véase Emanuel et "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs," J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012)), por ejemplo midiendo la fatiga, los sudores nocturnos, la picazón, el malestar abdominal, el dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, la saciedad temprana y el dolor óseo (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept; por ejemplo, en sujetos que logran una reducción $\geq 50\%$ en el síntoma de fatiga medido por el MPN-SAF. En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con la proporción de sujetos que logran una reducción $\geq 50\%$ en la puntuación total de síntomas (TSS) registrada y evaluada a través del Formulario de Evaluación de Síntomas de Neoplasia Mieloproliferativa modificado (MPN-SAF), (véase Emanuel et al., "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs," J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012)), por ejemplo midiendo la fatiga, los sudores nocturnos, la picazón, el malestar abdominal, el dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, la saciedad temprana y el dolor óseo (por ejemplo, en sujetos que recibieron luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con las medidas de calidad de vida relacionada con la salud (HRQoL), por ejemplo midiendo los cambios medios en las puntuaciones de los dominios del cuestionario de HRQoL en comparación con las puntuaciones al inicio (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con las puntuaciones de los cuestionarios EQ-5D-5L (EuroQol, Rotterdam, Países Bajos), por ejemplo midiendo los cambios medios en las puntuaciones de los dominios del cuestionario EQ-5D-5L en comparación con las puntuaciones al inicio (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide en relación con los eventos adversos (EA), por ejemplo el tipo, la frecuencia y la gravedad de los eventos adversos (por ejemplo, en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide usando anticuerpos antifármacos (ADA) (por ejemplo, frecuencia de anticuerpos antifármacos y efectos sobre la eficacia, seguridad o farmacocinética en sujetos que reciben luspatercept). En algunas realizaciones, la respuesta de la anemia se mide usando parámetros farmacocinéticos, por ejemplo curva de concentración plasmática-tiempo, área bajo la curva (AUC), Cmax (por ejemplo, para sujetos que reciben luspatercept).

En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra mediante inyección. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra por vía subcutánea. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra una vez cada 3 semanas. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En realizaciones específicas, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es un

polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En una realización preferida, el inhibidor de la señalización de ActRIIB es luspatercept. Ensayos

Se pueden probar diversas variantes del polipéptido ActRIIB, o variantes solubles del polipéptido ActRIIB, para determinar su capacidad para inhibir la señalización de ActRIIB. Además, se puede probar la capacidad de los compuestos para inhibir la señalización de ActRIIB. Una vez que se confirma la actividad de los inhibidores de la señalización de ActRIIB, estos compuestos se pueden usar con los métodos proporcionados aquí. Los ensayos que siguen se describen para ActRIIA, pero se pueden realizar análogamente para ActRIIB.

Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRIIA sobre la expresión de genes implicados en la producción de hueso o destrucción de hueso. Esto se puede realizar, según se necesite, en presencia de una o más proteínas de ligando de ActRIIA recombinante (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido ActRIIA y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActRIIA. Asimismo, un polipéptido ActRIIA se puede administrar a un ratón u otro animal, y se pueden evaluar una o más propiedades del hueso, tales como densidad o volumen. También se puede evaluar la tasa de consolidación de las fracturas óseas. La absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA) es una técnica bien establecida, no invasiva y cuantitativa para evaluar la densidad ósea en un animal. En seres humanos se pueden usar sistemas de DEXA centrales para evaluar la densidad ósea en la columna vertebral y la pelvis. Estos son los mejores factores pronósticos de la densidad ósea global. Se pueden usar sistemas de DEXA periféricos para evaluar la densidad ósea en huesos periféricos, que incluyen, por ejemplo, los huesos de la mano, la muñeca, el tobillo y el pie. Se pueden usar sistemas de obtención de imágenes por rayos X tradicionales, que incluyen TAC, para evaluar el crecimiento de hueso y la consolidación de la fractura. Además, la densidad ósea se puede medir usando tomografía computarizada cuantitativa (qCT). También se puede evaluar la resistencia mecánica del hueso.

En ciertos aspectos, se proporciona aquí el uso de polipéptidos ActRIIA (por ejemplo, polipéptidos ActRIIA solubles) y polipéptidos de activina para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de activina-ActRIIA. Los compuestos identificados mediante esta selección se pueden probar para evaluar su capacidad para modular el crecimiento o la mineralización óseos *in vitro*. Opcionalmente, estos compuestos se pueden probar además en modelos animales para evaluar su capacidad para modular el crecimiento de tejido *in vivo*.

Existen numerosos enfoques para cribar agentes terapéuticos para modular el crecimiento de tejido por direccionamiento de activina y polipéptidos ActRIIA. En ciertas realizaciones, el cribado de alta resolución de compuestos se puede llevar a cabo identificando agentes que perturban los efectos mediados por activina o ActRIIA sobre el hueso. En ciertas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIA a activina. Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIA a activina. En una realización adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con un polipéptido de activina o ActRIIA.

Será suficiente una variedad de formatos de ensayo y, en vista de la presente divulgación, aquellos no explícitamente descritos en el presente documento serán, sin embargo, comprendidos por un experto habitual en la técnica. Como se describe en el presente documento, los compuestos de prueba (agentes) usados en el presente documento pueden ser creados por cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas que existen de forma natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se van a probar para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento tisular se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producidos de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados en el presente documento incluyen moléculas orgánicas no de peptidilo, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas del ácido nucleico. En una realización específica, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 daltones.

Los compuestos de prueba se pueden proporcionar como entidades discretas individuales, o proporcionar en bibliotecas de mayor complejidad, tales como preparadas por química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en o una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en etapas de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden ser derivatizados con otros compuestos y tener grupos de derivatización que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitativos de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatona S transferasa (GST), reticulantes fotoactivables, o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de selección de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alta resolución para maximizar el número de compuestos analizados en un período de tiempo dado. Se prefieren frecuentemente ensayos que se realizan en sistemas sin células, tal que se puedan

derivar con proteínas purificadas o semipurificadas, como cribados "primarios" ya que se pueden generar para permitir el rápido desarrollo y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba pueden ser, en general, ignorados en el sistema *in vitro*, estando el ensayo en su lugar centrado principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIA y activina.

Simplemente para ilustración, en un ensayo de cribado a modo de ejemplo, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIA aislado y purificado que es, en general, capaz de unirse a activina. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIA se añade entonces una composición que contiene un ligando de ActRIIA. La detección y cuantificación de complejos de ActRIIA/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciamiento) de la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIA y activina. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de respuesta a dosis de datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar un nivel basal para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActRIIA, y la formación del complejo ActRIIA/activina se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, se puede variar el orden en el que los reactantes se pueden mezclar, y se pueden mezclar simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos celulares y lisados para obtener un sistema de ensayo sin células adecuado.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIA y activina 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 polipéptido ActRIIA o activina radiomarcados (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C o ³H), marcados fluorescentemente (por ejemplo, FITC) o marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo, o mediante detección cromatográfica.

En ciertos casos, se contempla aquí el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, ya sea directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y la patente de EE. UU. n.º 5.677.196), resonancia de plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas realizaciones descritas en el presente documento.

Además, se puede usar un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRIIA y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). En una realización específica, se contempla aquí el uso de dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIA 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 de EE.UU. n.º 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

En ciertos casos, los compuestos en cuestión se identifican por su capacidad para interactuar con un polipéptido ActRIIA o activina. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIA o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar al nivel de proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, que incluyen fotorreticulación, unión a ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby W B et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos se pueden cribar en un ensayo basado en mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido activina o ActRIIA. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o fase líquida. Como alternativa, el gen que codifica una activina o un polipéptido ActRIIA se puede transfectar con un sistema informador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa, o proteína fluorescente verde) en una célula, y analizarse frente a la biblioteca, preferiblemente mediante un análisis de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, perla o chip, o capturar por un anticuerpo inmovilizado o resolver por electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar normalmente usando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmones superficiales.

6. EJEMPLOS

6.1 EJEMPLO 1: ESTUDIO DE FASE 2, MULTICÉNTRICO, ABIERTO, PARA EVALUAR LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LUSPATERCEPT EN SUJETOS CON MIELOFIBROSIS ASOCIADA A NEOPLASIA MIELOPROLIFERATIVA Y ANEMIA CON Y SIN DEPENDENCIA DE TRANSFUSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

Este ejemplo se refiere a un estudio de fase 2, multicéntrico y abierto para evaluar luspatercept, un inhibidor de la señalización de ActRIIB, en sujetos con mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa que tienen anemia, con y sin dependencia de transfusiones de glóbulos rojos. El estudio se divide en un período de selección, un período de tratamiento (que consiste en una fase primaria, una evaluación de la respuesta a la enfermedad el día 169 y una fase de extensión), seguido de un período de seguimiento postratamiento. El propósito de este estudio de fase 2 es evaluar si existe una señal de eficacia con luspatercept en pacientes con MF asociada a MPN que son anémicos y pueden o no depender de transfusiones de glóbulos rojos, corrigiendo la eritropoyesis ineficaz y disminuyendo así la anemia, una afección que se desarrolla en casi todos los pacientes con MF asociada a MPN (de los cuales la fatiga es un síntoma).

Los sujetos que satisfacen los criterios de elegibilidad se asignan a una de las siguientes cohortes (que se inscriben en paralelo) según su elegibilidad: (I) Cohorte 1: contiene hasta 20 sujetos con anemia solamente que no están recibiendo actualmente transfusiones de glóbulos rojos (estos sujetos se denominan "anemia sólo" en este ejemplo, definidos como que han recibido 0 unidades de glóbulos rojos/84 días inmediatamente hasta la fecha del Ciclo 1, Día 1 (C1D1)); (II) Cohorte 2: contiene hasta 20 sujetos que dependen de transfusiones de glóbulos rojos (estos sujetos se denominan "dependientes de transfusión de glóbulos rojos" en este ejemplo, definidos como que han recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos/28 días durante al menos los 84 días inmediatamente hasta la fecha C1D1); (III) Cohorte 3A: contiene ≥ 10 sujetos (la Cohorte 3 contiene 30 sujetos en total) que cumplen con los criterios de elegibilidad para la Cohorte 1 (anemia sólo) mientras reciben una dosis estable de ruxolitinib durante al menos 112 días inmediatamente antes de la fecha de inscripción; y (IV) Cohorte 3B: contiene ≥ 10 sujetos (la Cohorte 3 contiene 30 sujetos en total) que cumplen los criterios de elegibilidad para la Cohorte 2 (dependientes de transfusión de glóbulos rojos) mientras reciben una dosis estable de ruxolitinib durante al menos 112 días inmediatamente antes de la fecha de inscripción. En total, el estudio incluirá a aproximadamente 70 sujetos en todo el mundo.

6.1.1 Medidas de resultados primarios

Las siguientes son las medidas de resultados primarios para el ensayo de fase 2: (i) respuesta de la anemia en relación con el aumento de la hemoglobina (Hgb) (proporción de sujetos de las cohortes 1 y 3A que alcanzan un aumento de hemoglobina $\geq 1,5$ g/dl desde el valor al inicio durante cualquier período consecutivo de 84 días sin una transfusión de glóbulos rojos; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta el día 168); (ii) respuesta de la anemia en relación con el aumento de la independencia de la transfusión de glóbulos rojos (proporción de sujetos de las cohortes 2 y 3B que quedan libres de transfusiones de glóbulos rojos durante cualquier período consecutivo de 84 días; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta el día 168); (iii) tiempo hasta la respuesta de la anemia (tiempo desde la primera dosis de luspatercept hasta la primera aparición de la respuesta de la anemia en cada una de las cohortes; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años). (iv) duración de la respuesta de la anemia (la duración máxima de la respuesta de la anemia en cada una de las cohortes; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años); (v) frecuencia de transfusiones de glóbulos rojos (el número medio de unidades de glóbulos rojos transfundidas por sujeto cada cuatro semanas; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años); (vi) frecuencia de la dependencia de las transfusiones de glóbulos rojos (proporción de sujetos que dependen de las transfusiones de glóbulos rojos que reducen su carga de transfusión en ≥ 50 % desde el inicio durante cualquier período consecutivo de 84 días; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años); (vii) proporción de sujetos que logran una reducción ≥ 50 % en el síntoma de fatiga, un síntoma común entre los pacientes con mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa que tienen anemia, según lo registrado y evaluado a través del Formulario de Evaluación de Síntomas de Neoplasia Mieloproliferativa modificado (MPN-SAF), (véase Emanuel et al., "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs," J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012); el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años); (viii) proporción de sujetos que logran una reducción ≥ 50 % en la puntuación total de síntomas (TSS). Síntomas relacionados con la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa (MPN) (fatiga, sudores nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad temprana, y dolor óseo) registrados y evaluados a través del Formulario de Evaluación de Síntomas de Neoplasia Mieloproliferativa modificado (MPN-SAF), (véase Emanuel et al., "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs," J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012); (ix) calidad de vida relacionada con la salud (CVRS): la medida de los cambios medios en las puntuaciones del dominio del cuestionario de CVRS a lo largo del estudio se comparan con las puntuaciones al inicio (el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente 2 años); (x) cuestionarios EQ-5D-5L (EuroQol, Róterdam, Países Bajos): la medida de los cambios medios en las puntuaciones del dominio del cuestionario EQ-5D-5L a lo largo del estudio se comparan con las puntuaciones al inicio (el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente 2 años); (xi) eventos adversos (EA) (incluido el tipo, la frecuencia y la gravedad, se evalúan; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente 2 años); (xii) anticuerpos antifármacos (ADA) (frecuencia de anticuerpos antifármacos y efectos sobre la eficacia, la seguridad o la farmacocinética; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente 2 años); (xiii) farmacocinética (área bajo la curva (AUC) y Cmax; el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años); y (xiv) Evaluación Funcional de la Terapia contra el Cáncer - Anemia (FACT-An): la medida de los cambios medios en las

puntuaciones de los dominios del cuestionario FACT-An a lo largo del estudio se comparan con las puntuaciones al inicio (el marco de tiempo de las medidas es aproximadamente hasta 2 años).

6.1.2 Criterios de inclusión

- 5 Los sujetos deben cumplir los criterios de esta sección para ser inscritos en el estudio (la fecha de inscripción se define como la fecha en la que al sujeto se le asigna una cohorte en Tecnología de Respuesta Integrada [IRT]) y recibe su primera dosis de luspatercept.
- 10 El sujeto debe tener ≥ 18 años de edad al momento de firmar el formulario de autorización escrita (FAE).
- El sujeto tiene mielofibrosis asociada a MPN (PMF, MF post-PV,y/o MF post-ET) según lo confirmado por el informe patológico local.
- 15 El sujeto tiene anemia definida como: (I) Cohortes 1 y 3A: (a) el sujeto tiene ≥ 3 niveles de Hgb de $\leq 9,5$ g/dl registrados en ≥ 3 días diferentes, incluido el día de la dosificación, en el período de 84 días inmediatamente anterior a la fecha C1D1; no se inscriben sujetos con un intervalo ≥ 42 días entre las medidas de hemoglobina; y (b) no debe haber ninguna transfusión de glóbulos rojos dentro del período de 84 días inmediatamente anterior a la fecha C1D1; y (11) Cohortes 2 y 3B: (a) el sujeto tiene una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos/28 días durante al menos los 84 días inmediatamente anteriores a la fecha C1D1; no debe haber ningún intervalo > 42 días sin ≥ 1 transfusión de glóbulos rojos; (b) los sujetos deben tener un valor de Hgb de ≤ 13 g/dl en el C1D1 antes de la administración de luspatercept; (c) para determinar la elegibilidad, sólo se puntúan las transfusiones de glóbulos rojos administradas cuando la Hgb $\leq 9,5$ g/dl; y (d) las transfusiones de glóbulos rojos administradas debido a hemorragia, infección, o anemia inducida por quimioterapia
- 20 no se puntúan para determinar la elegibilidad.
- 25 El sujeto tiene una puntuación de estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de ≤ 2 . Véase, por ejemplo, Oken et al. (1982). "Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group". Am. J. Clin. Oncol. 5 (6): 649-55, respecto a la puntuación de estado funcional ECOG. Un sujeto con una puntuación de estado funcional ECOG de 0 es asintomático (es decir, completamente activo, capaz de realizar todas las actividades previas a la enfermedad sin restricciones). Un sujeto con una puntuación de estado funcional ECOG de 1 es sintomático pero completamente ambulatorio (es decir, restringido en la actividad física extenuante pero ambulatorio, y capaz de realizar trabajos de naturaleza ligera o sedentaria, por ejemplo tareas domésticas ligeras, trabajo de oficina). Un sujeto con una puntuación de estado funcional ECOG de 2 es sintomático, $<50\%$ en cama durante el día (es decir, ambulatorio y capaz de cuidar de sí mismo pero incapaz de realizar ninguna actividad laboral; despierto y activo más del 50% de las horas de vigilia). Un sujeto con una puntuación de estado funcional ECOG de 3 es sintomático, $>50\%$ en cama, pero no confinado a cama (es decir, capaz de sólo un cuidado personal limitado, confinado en cama o silla el 50% o más de las horas de vigilia). Un sujeto con una puntuación de estado funcional ECOG de 4 está postrado en cama (es decir, completamente discapacitado; no puede realizar ningún cuidado personal; totalmente confinado a la cama o a una silla). Un sujeto que tenga una puntuación de estado funcional ECOG de 5 está muerto.
- 30 No se prevé que el sujeto reciba durante los 6 meses a partir de la fecha C1D1 un trasplante de células hematopoyéticas.
- 35 Para este estudio, se define como mujer en edad fértil (FCBP) una mujer que: (1) ha alcanzado la menarquia en algún momento; y (2) no se ha sometido a una histerectomía o terapia bilateral (no descarta el potencial fértil) durante al menos 24 meses consecutivos (es decir, ha tenido la menstruación en cualquier momento durante los 24 meses consecutivos anteriores). La FCBP que participe en el estudio deberá: (a) tener 2 pruebas de embarazo negativas verificadas por el investigador antes de comenzar la terapia del estudio; debe aceptar pruebas de embarazo continuas durante el transcurso del estudio y después de finalizar el tratamiento del estudio, esto se aplica incluso si el sujeto practica una abstinencia real de contacto heterosexual; y (b) comprometerse a una abstinencia real de contacto heterosexual (que debe revisarse mensualmente y documentarse la fuente) o aceptar usar, y poder cumplir con, un método anticonceptivo eficaz sin interrupción, 28 días antes de comenzar el producto
- 40 en investigación, durante la terapia del estudio (incluidas las interrupciones de la dosis) y durante 12 semanas (aproximadamente 5 veces la vida media terminal media de luspatercept según los datos de farmacocinética [PK] de dosis múltiples) después de la interrupción de la terapia del estudio.
- 45 Los sujetos masculinos deben: (a) practicar una abstinencia verdadera (que debe revisarse mensualmente) o aceptar usar un condón durante el contacto sexual con una mujer embarazada o una mujer en edad fértil mientras participa en el estudio, durante las interrupciones de la dosis y durante al menos 12 semanas (aproximadamente 5 veces la vida media terminal media de luspatercept según los datos de farmacocinética de dosis múltiples) después de la interrupción del producto en investigación, incluso si se ha sometido a una vasectomía exitosa.
- 50 El sujeto debe comprender y firmar voluntariamente un formulario de autorización escrita antes de que se realice cualquier evaluación o procedimiento relacionado con el estudio.
- 55
- 60
- 65

El sujeto está dispuesto y es capaz de cumplir con el cronograma de visitas de estudio y otros requisitos del protocolo.

5 **6.1.3 Método de tratamiento**

La dosis de luspatercept es 1,75 mg/kg.

Luspatercept se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días durante un máximo de 2 años.

10 **6.2 EJEMPLO 2**

6.2.1 Antecedentes

15 La mielofibrosis (MF) asociada a neoplasia mieloproliferativa (MPN es una neoplasia mieloide clonal caracterizada por fibrosis de la médula ósea, función defectuosa de la médula ósea, hematopoyesis extramedular, una propensión a la transformación a fase blástica, e inflamación (Mesa RA, et al. Leuk Res. 2011;35(1):12-13). La anemia y la dependencia de la transfusión de glóbulos rojos (TD) son variables pronósticas y predictivas adversas independientes para la supervivencia entre estos pacientes (Passamonti F, et al. Blood. 2010;115(9): 1703-1708; Elena C, et al. Haematologica. 2011;96(1): 167-170).

Luspatercept es una proteína de fusión recombinante que consiste en un receptor de activina tipo IIB modificado unido al dominio Fc de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1) (Figura 1) (Attie KM, et al. Am J Hematol. 2014;89(7):766-770; Suragani RN, et al. Nat Med. 2014;20(4):408-414). Luspatercept actúa como un agente de maduración eritroide al unirse a ligandos específicos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), tal como el factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF11), bloqueando su efecto inhibitor y provocando un aumento de la producción de glóbulos rojos (Suragani RN, et al. Nat Med. 2014;20(4):408-414). En un estudio reciente de fase 2, se demostró que luspatercept es eficaz y bien tolerado para el tratamiento de la anemia en pacientes con síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo (Platzbecker U, et al. Lancet Oncol. 2017;18(10):1338-1347).

El objetivo de este ensayo clínico es evaluar la eficacia y seguridad de luspatercept para el tratamiento de la anemia en pacientes con MF asociada a MPN con o sin RBC-TD.

35 **6.2.2 Detalles del estudio**

Este ejemplo se refiere a un estudio de fase 2, multicéntrico y abierto, en curso.

6.2.3 Población de estudio

40 Los criterios de inclusión para este estudio son: (i) edad ≥ 18 años; (ii) MF asociada a MPN (MF primaria, MF post-policitemia vera, o MF post-trombocitemia esencial); (iii) anemia, definida como: (a) Cohortes 1 y 3a: ≥ 3 niveles de hemoglobina (Hb) $\leq 9,5$ g/dl en ≥ 3 días (incluido el día de la dosificación), sin transfusiones de glóbulos rojos en los 84 días anteriores al día 1 del ciclo 1 (C1D1); se excluirán ≥ 42 días entre medidas; (b) Cohortes 2 y 3b: frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2-4 unidades de glóbulos rojos/28 días durante ≥ 84 días antes de C1D1, sin intervalo > 42 días sin ≥ 1 transfusión de glóbulos rojos; Hb < 13 g/dl en C1D1 antes de la administración de luspatercept; y (iv) estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group ≤ 2 .

6.2.4 Diseño del estudio y tratamiento:

50 El estudio comprende 3 periodos (Figura 2): (i) Período de selección; (ii) Período de tratamiento (fase primaria, evaluación de la respuesta de la enfermedad el día 169 y fase de extensión); y (iii) Período de seguimiento postratamiento.

55 **(a) Período de selección**

Todos los procedimientos de selección se realizan ≤ 28 días antes de la inscripción.

60 **(b) Período de tratamiento**

65 Todos los pacientes recibirán luspatercept 1 mg/kg por vía subcutánea el día 1 de cada ciclo de 21 días. Los pacientes se inscribirán en cohortes según el requisito de transfusión de glóbulos rojos: (i) Cohortes 1 y 3a (anemia sólo); y (ii) Cohortes 2 y 3b (RBC-TD). La mejor atención de apoyo se puede usar en combinación con el tratamiento del estudio. La evaluación de la respuesta de la enfermedad debe completarse el día 169 después de la primera dosis del tratamiento del estudio. Los pacientes que responden al tratamiento pueden continuar el tratamiento durante hasta 1,5 años más. Los que no respondan suspenderán el tratamiento.

(c) Período de seguimiento postratamiento

Después de suspender el tratamiento, se recopilarán datos de seguridad de seguimiento hasta 42 días después de la última dosis del tratamiento del estudio. Entonces se recopilarán datos de seguridad cada 3 meses durante hasta 3 años después de la última dosis del tratamiento del estudio o hasta la muerte, la retirada del consentimiento, o la pérdida del seguimiento.

6.2.5 Criterios de valoración

Los criterios de valoración primarios y secundarios se enumeran en la Tabla 1 (a continuación). Los criterios de valoración exploratorios incluyen exposición-respuesta al tratamiento, biomarcadores, y análisis mutacionales. Todos los análisis de eficacia se realizarán principalmente en la población con intención de tratar, definida como todos los pacientes inscritos. Se realizarán análisis confirmatorios de eficacia en la población evaluable en cuanto a eficacia, definida como todos los pacientes que: (i) recibieron ≥ 3 ciclos de tratamiento del estudio y permanecieron en el estudio durante ≥ 21 días después de la tercera dosis del estudio; o (ii) alcanzaron una Hb > 13 g/dl en < 3 ciclos. Se realizarán análisis de seguridad en todos los pacientes que reciban ≥ 1 dosis del tratamiento del estudio. Los eventos adversos y las anomalías de laboratorio se clasifican según el NCI-CTCAE versión 4.03. Los análisis farmacocinéticos se basarán en todos los pacientes que tengan datos de concentración evaluables, para determinar los parámetros farmacocinéticos.

6.2.6 Análisis estadísticos

Se usarán principalmente análisis estadísticos descriptivos. El método de Kaplan-Meier se puede usar para estimar la duración de la respuesta de la anemia. No se realizarán comparaciones inferenciales entre las cohortes.

6.2.7 Estado del estudio

La inscripción comenzó en noviembre de 2017. El objetivo de inscripción es 70 pacientes con MF asociada a MPN y anemia, con o sin RBC-TD. Hacia el 9 de abril de 2018, se han inscrito 12 pacientes en el estudio en 24 sitios clínicos.

Tabla 1. Criterios de valoración del estudio

Criterios de valoración	Cohortes 1 y 3a (anemia sólo)	Cohortes 2 y 3b (RBC-TD)
Primario	$\geq 1,5$ g/dl de aumento de Hb desde el inicio durante cualquier período consecutivo de 84 días sin una transfusión de glóbulos rojos	RBC-TI durante cualquier período consecutivo de 84 días
Secundario	• Tiempo hasta la respuesta de la anemia	• Tiempo hasta la respuesta de la anemia
	• Duración de la respuesta de la anemia	• Duración de la respuesta de la anemia
	• Mejora de la respuesta de los síntomas (definida como una reducción $\geq 50\%$ en los síntomas de fatiga, o una reducción $\geq 50\%$ en la puntuación total de los síntomas según MF-SAF o MPN-SAF)	• Frecuencia de transfusiones de glóbulos rojos (unidades medias de glóbulos rojos/4 semanas)
	• Mejora de CVRS	• Frecuencia de RBC-TD (definida como una reducción en la carga de transfusión de $\geq 50\%$ desde el inicio durante cualquier período consecutivo de 84 días)
	• Seguridad	
	• Farmacocinética	• Mejora de la respuesta de los síntomas (definida como una reducción $\geq 50\%$ en los síntomas de fatiga, o una reducción $\geq 50\%$ en la puntuación total de los síntomas según MF-SAF o MPN-SAF)
	• Anticuerpos antifármacos	• Mejora de HRQoL
		• Seguridad
		• Farmacocinética
		• Anticuerpos antifármacos

Criterios de valoración	Cohortes 1 y 3a (anemia sólo)	Cohortes 2 y 3b (RBC-TD)
Hb, hemoglobina; CVRS, calidad de vida relacionada con la salud; MF-SAF, Formulario de Evaluación de Síntomas de Mielofibrosis; MPN-SAF, Formulario de Evaluación de Síntomas de Neoplasia Mieloproliferativa; RBC, glóbulo rojo; TD, dependencia de la transfusión; TI, independencia de la transfusión.		

7. INFORMACIÓN DE SECUENCIAS

5 Tabla 2.

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	Dominio extracelular de ActRIIA humano fusionado con el dominio Fc humano	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLHPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTKSKAKGO PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
2	Secuencia conductora de melitina de abeja melífera (HBML)	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
3	secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	MTAPWVALALLWGSLLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFNQYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT LLTVLAYSLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV WKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLGKNIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF GLAVRFEPGKPPGDTHGOVGTTRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEEEEIGQHPSEELQEVVVHKKMRPTIKD HWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGTTSDDLVSLSVTNTVDLPPKES SI
4	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 19-134 de SEQ ID NO:3)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNQY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
5	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia polipeptídica procesada con	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY
	los 15 aminoácidos C-terminales eliminados (aminoácidos 19-119 de SEQ ID NO:3)	DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
6	secuencia del ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTC TGGGGATCGCTGTGGCCCGGCTCTGGGCGTGGG GAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGA GCGGCCCTGGAGCGCTGCCAAGGCGAGCAGGAC AAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAAC AGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGG CTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAG GCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCC AGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCT GCAACGAGCGCTTCACTCATTGTCAGAGGCTG GGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCG ACAGCCCCACCCCTGCTCACGGTGTCTGGCCTAC TCACTGCTGCCCATCGGGGGCCTTCCCTCATC GTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGC AAGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAG GACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCTCTGGTG GGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAA GGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGC CCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGAT CTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAA GCACGAGAACCCTGCTACAGTTCATTCGTGCCGA GAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCC TCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACAT GGAACGAACCTGTGTATGTAGCAGAGACGATG TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTG CCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCT ATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTA TTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCT GACTTTGGCTTGGCTGTTTCGATTTGAGCCAGGG AAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGG CACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGA GGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCCTTCT GCGCATGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCT GTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGA CGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGA GGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATG AGGCCCACCATTAAAGATCACTGGTTGAAACAC CCGGGCCTGGCCAGCTTTGTGTGACCATCGAG GAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTG TCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTG ATTCCGAGGTCCGTCAACGGCACTACCTCGGAC TGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCAACCAATG TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA
7	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64; SEQ ID NO: 17) fusionado con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPITGGGTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
8	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64) con los 15 aminoácidos C-terminales eliminados (SEQ ID NO: 5) fusionado con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC FSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 14) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPT
10	Proteína de fusión ActRIIB-Fc no procesada	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYY

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC eliminados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC eliminados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:14) y con una mutación L 79D y con secuencia líder TPA	NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
11	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC eliminados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC eliminados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:14) y con una mutación L79D (es decir, luspatercept)	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
12	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:3)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
13	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO:3)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
14	Secuencia de la proteína precursora de ActRIIB humano (R64)	MTAPWVALALLWGS LWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT LLTVLAYSLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV WKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF
		GLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEEBIGQHPSELEBLQEVV VHK KMRPTIKD IWLKIIPGLAQLCVTIEECWDIIDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPKES SI
15	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia polipeptídica procesada (aminoácidos 19-134 de SEQ ID NO: 14)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPT
16	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 19-119 de SEQ ID NO: 14)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
17	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO: 14)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
18	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO: 14)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
19	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:3) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPT
20	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos carboxiterminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:3) y con una mutación L79D y con secuencia conductora de TPA	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWAN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
21	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con los 6 aminoácidos aminoterminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:3) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
22	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia polipeptídica procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO: 14) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
23	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:3) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
24	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia polipeptídica procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO: 14) con mutación L79D fusionada a un dominio Fc con un enlazador GGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
		VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
25	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:3) con mutación L79D fusionada con un dominio Fc	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYLPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia polipeptídica procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO: 14) con mutación L79D fusionada a un dominio Fc y con secuencia líder TPA	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEATR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
27	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada (aminoácidos 20-134 de SEQ ID NO:3) con mutación L79D fusionada con un dominio Fc y con secuencia conductora de TPA	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEP PPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKI TVDKSRWQQ GNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK*
28	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada que tiene una secuencia carboxiterminal de variante (desvelada en el documento de patente WO2007/053775)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCL EGPAHE
29	ActRIIB soluble humano	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ
	(extracelular), secuencia polipeptídica procesada que tiene una secuencia C-terminal variante (descrita en el documento WO2007/053775) que tiene una mutación L79D	DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCL EGPAHE
30	ActRIIB soluble humano (extracelular), secuencia de polipéptidos procesada que tiene una secuencia carboxiterminal de variante (desvelada en el documento de patente WO2007/053775) que tiene una mutación L79D fusionada con un dominio Fc con un conector TGGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCL EGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKI TVDKSRW QQGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
31	Secuencia del ácido nucleico que codifica SEQ ID NO:10	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTTCGTTTCGCCC GGCGCCGCCGAAACCCGCGAATGTATTTATTAC AATGCTAATTGGGAACTCGAACGGACGAACCA ATCCGGGCTCGAACGGTGTGAGGGGGAACAGG ATAAACGCCTCCATTGCTATGCGTCGTGGAGGA ACTCCTCCGGGACGATTGAACTGGTCAAGAAAG GGTGCTGGGACGACGATTTCAATTGTTATGACC GCCAGGAATGTGTCGCGACCGAAGAGAATCCG CAGGCTATTTCTGTTGTGCGAGGGGAATTTCT GTAATGAACGGTTTACCCACCTCCCCGAAGCCG GCGGGCCCGAGGTGACCTATGAACCCCCGCC ACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCTGCCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCA
		AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGCAGCCGAGAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA TGA
32	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64; SEQ ID NO: 15) fusionado con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK ENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
33	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64) con los 15 aminoácidos C-terminales eliminados (SEQ ID NO: 16) fusionado con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
34	Dominio extracelular de ActRIIA humano fusionado con el dominio Fc humano	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso en un método para tratar la anemia en un sujeto que tiene mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa, en el que el sujeto se ha tratado previamente con ruxolitinib, en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB es una proteína de fusión que comprende: (a) un fragmento del dominio extracelular de ActRIIB, en el que el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (b) un enlazador; y (c) un Fc de una IgG.
- 10 2. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de la reivindicación 1, en el que el tratamiento reduce o alivia uno o más síntomas de la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa en el sujeto.
- 15 3. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de la reivindicación 2, en el que el síntoma es uno o más de fatiga, sudores nocturnos, picazón, malestar abdominal, dolor debajo de las costillas del lado izquierdo, saciedad temprana, o dolor óseo.
- 20 4. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto ha estado tomando una dosis estable de ruxolitinib durante al menos 112 días inmediatamente antes de la administración al sujeto del inhibidor de la señalización de ActRIIB.
- 25 5. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la mielofibrosis asociada a neoplasia mieloproliferativa es
 - (i) mielofibrosis primaria;
 - (ii) mielofibrosis posterior a policitemia vera; o
 - (iii) mielofibrosis posterior a trombocitemia esencial.
- 30 6. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto es:
 - (i) independiente de la transfusión de glóbulos rojos; o
 - (ii) dependiente de la transfusión de glóbulos rojos.
- 35 7. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de la reivindicación 6, en el que:
 - (i) el sujeto es independiente de la transfusión de glóbulos rojos si ha recibido 0 unidades de glóbulos rojos durante un período de tiempo de 84 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto; o
 - (ii) el sujeto depende de una transfusión de glóbulos rojos si ha recibido una frecuencia promedio de transfusión de glóbulos rojos de 2 a 4 unidades de glóbulos rojos cada 28 días durante un período de tiempo de al menos 84 días antes de la administración del inhibidor de la señalización de ActRIIB al sujeto.
- 40 8. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad farmacéuticamente eficaz es 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg, opcionalmente en el que la cantidad farmacéuticamente eficaz es 1,0 mg/kg.
- 45 9. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto:
 - (i) una vez cada 21 días, una vez cada 28 días, o una vez cada 48 días;
 - (ii) por vía intravenosa o subcutánea; o
 - (iii) por vía subcutánea una vez cada 21 días.
- 50 10. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la IgG es una IgG1.
- 55 11. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB es
 - (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11;
 - (ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO:11; o
 - (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11.
- 60 12. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el sujeto es un ser humano.
- 65 13. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método comprende administrar al sujeto una dosis de 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg del inhibidor de la señalización de ActRIIB, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB se administra al sujeto por vía subcutánea una vez cada 21 días, y en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB:
 - (i) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11;

(ii) comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11; o
(iii) consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

5 14. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el inhibidor de la señalización de ActRIIB se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable como composición farmacéutica.

15. El inhibidor de la señalización de ActRIIB para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el fragmento consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

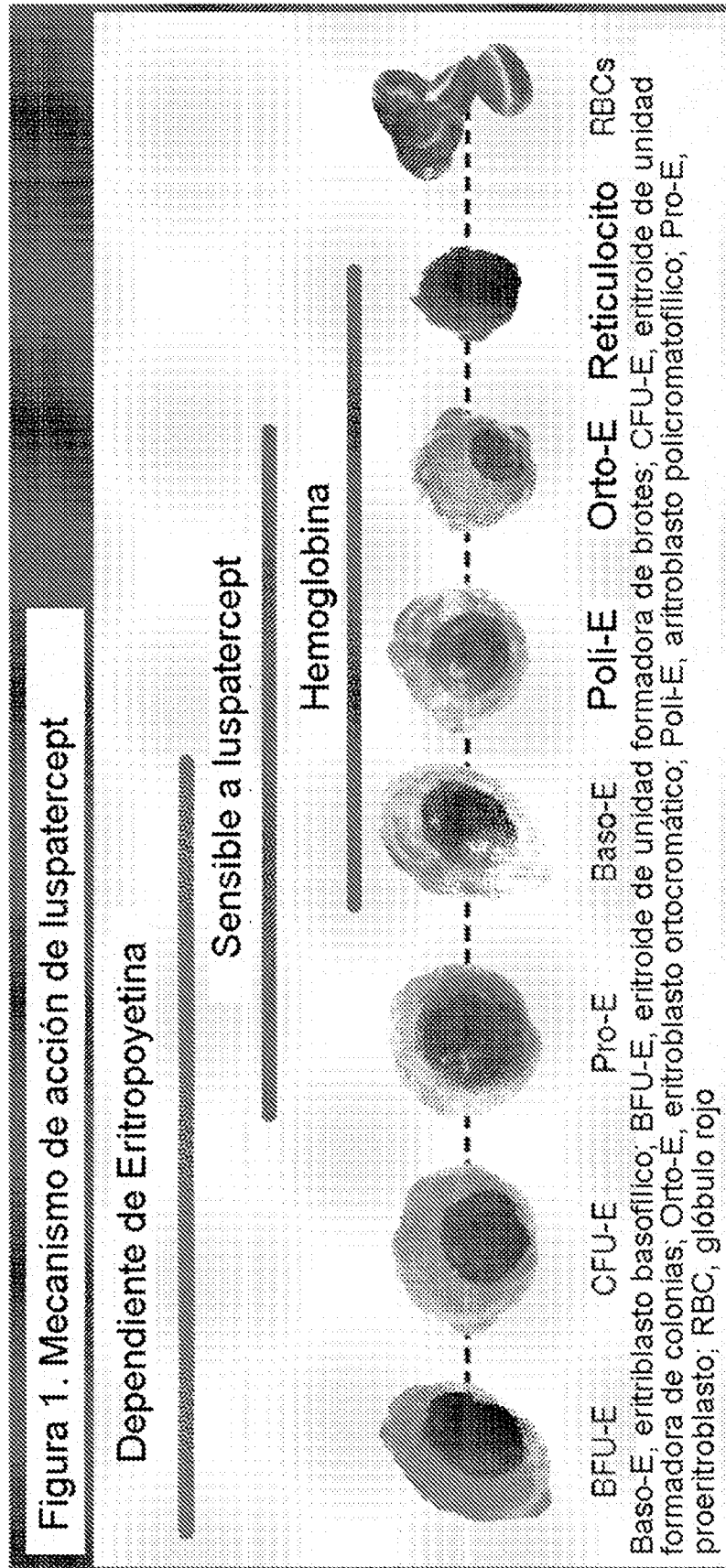


Fig. 1

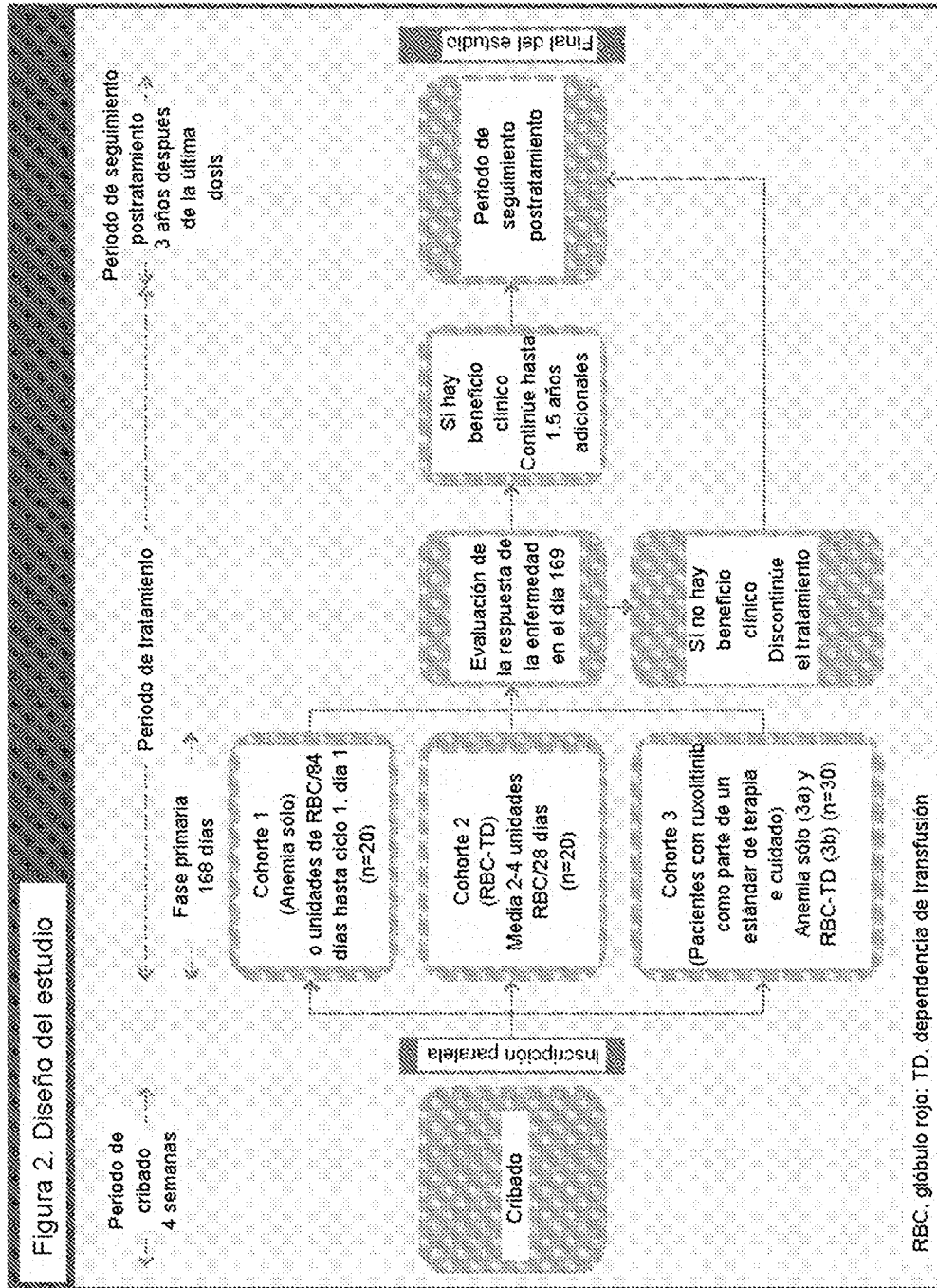


Fig. 2